

**Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Rheumatologie und Klinische Immunologie  
der medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin**

**DISSERTATION**

**Untersuchungen zur Wirkung von Hypoxie auf bioenergetisch relevante  
Funktionen von stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen**

**Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin**

**von**

**René Dziurla**

**aus Berlin**

**Dekan: Professor Dr. med. M. Paul**

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. B. Manger, Erlangen
2. Prof. Dr. R. Straub, Regensburg
3. Prof. Dr. F. Buttgereit, Berlin

eingereicht am: 3.5.2005

Datum der Promotion: 21.11.2005

### Kurzdarstellung

**Hintergrund:** Die Versorgung von Immunzellen mit Energie in Form von ATP ist Grundlage eines funktionstüchtigen Immunsystems. Diese wird durch die mitochondriale OXPHOS oder durch die zytosolische Glykolyse gewährleistet. Sauerstoff und Glukose stellen die Hauptsubstrate dieser Stoffwechselprozesse dar.

**Fragestellung:** Unter pathologischen Bedingungen wie sie in Entzündungsgebieten herrschen, konnte ein relativer Sauerstoffmangel experimentell nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, in welcher Weise die Funktionen einer definierten Lymphozytenpopulation (CD4+) durch Sauerstoffmangel beeinflusst werden.

**Methoden:** Nach Isolation von CD4+ Zellen aus peripherem Blut gesunder Spender, wurden definierte Zellmengen stimuliert und in einem mit einer Sauerstoffelektrode ausgestatteten Gefäß unter Luftabschluß inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben zur ATP-Messung entnommen, sowie Protein- und RNA-Lysate hergestellt. Die Vitalität zu Anfang und zum Ende der Inkubation wurde mittels Propidium-Jodid-Färbung im FACS bestimmt. Aus gesammelten Überständen wurden mittels Multiplex-ELISA die Konzentrationen von IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha und MCAF gemessen. Als Kontrollen dienten unter Normoxie inkubierte Aliquots der Zellsuspensionen. HIF-1alpha wurde mit Immunoblotting nachgewiesen. Transkriptionsänderungen von SOD1 und HK1 wurden durch SYBR-Green Real-Time-PCR quantifiziert.

**Ergebnisse:** Stimulierte CD4<sup>+</sup>-Zellen von Normalspendern schütten unter dem Einfluss von Hypoxie vermehrt proinflammatorische und chemotaktisch wirksame Zytokine, sowie zur Differenzierung notwendige antiinflammatorische Zytokine aus. Die Verfügbarkeit von Glukose hat hierauf einen verstärkenden Effekt. Eine hypoxische Umgebung sorgt in Abhängigkeit von der Versorgung mit Glukose für eine Anpassung der zellulären Atmungsrate. Glukose ist für die Aufrechterhaltung eines konstanten ATP-Levels verantwortlich. Die glykolytische Energiegewinnung unter Hypoxie kompensiert den Ausfall der OXPHOS. Hypoxie führt bei stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen bei freier Glukoseverfügbarkeit zu einer vermehrten Transkription des Hexokinase1-Gens. Glukosemangel bewirkt dagegen in hypoxischer Umgebung eine Transkriptionssteigerung des SOD1-Gens.

## Abstract

**Background:** The energy supply of immune cells in form of ATP is the cornerstone of a functional immune system. This supply is realized by either mitochondrial OXPHOS or cytosolic glycolysis. Oxygen and glucose present the main substrates in these metabolic processes.

**Objective:** Relative shortness of oxygen could be determined experimentally under pathological conditions present in inflamed tissues. The aim of this study was to determine the extent of hypoxic influence on the cellular function of CD4<sup>+</sup> lymphocytes.

**Methods:** Human CD4<sup>+</sup> cells were isolated from peripheral blood of healthy blood donors by MACS sorting. Following a defined protocol cells were stimulated and incubated in a sealed container with a Clark type electrode. Samples were taken for measurements of ATP content. RNA- and Protein lysates were made to quantify the transcription of SOD1 and HK1 by SYBR green RT-PCR and look for the presence of HIF-1alpha by immunoblot analysis respectively. Supernatants were used to measure the expression of IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha and MCAF using a multiplex ELISA assay. Aliquots of cell suspensions incubated under normoxic conditions served as controls.

**Results / Conclusion:** Under the influence of hypoxia stimulated CD4<sup>+</sup> lymphocytes of healthy blood donors express proinflammatory and chemotactically active as well as anti-inflammatory cytokines important for cell differentiation. The availability of glucose leads to an increase of this effect. An hypoxic environment dependant on the availability of glucose leads to an adaptation of cellular respiration. Glucose deficiency provokes an increase in cellular oxygen utilization. The availability of glucose is responsible for a constant intracellular ATP level. This proves that in CD4<sup>+</sup> lymphocytes glycolysis is capable of compensating for hypoxically impaired oxidative phosphorylation thus providing enough ATP to enable cellular function. Hypoxia under glucose provision leads to an increase in mRNA expression for HK1, a key enzyme of glycolysis. Lack of glucose under hypoxic conditions results in an increase in mRNA expression for SOD1. Glucose therefore serves in CD4<sup>+</sup> cells as an agent of constant energy supply that leads to cell survival and an upkeep of a proinflammatory environment through cytokine expression.

**Schlagworte:** Glukose, Hypoxie, Hexokinase-1, SOD1, HIF-1alpha, CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, Zytokine

## Schlagworte / Keywords

**Keywords:** Hypoxia, CD4<sup>+</sup> Lymphocytes, SOD1, HIF-1alpha, Hexokinase-1, Glucose, Cytokines

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1	DAS IMMUNSYSTEM UND UNTERSCHIEDUNGSMERKMALE FÜR VERSCHIEDENE T-LYMPHOZYTEN .....	9
1.2	DIE ENERGIEVERSORGUNG DER ZELLE, ENTSTEHUNG VON REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES (ROS) UND DIE FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON ADENOSINTRIPHOSPHAT (ATP) .....	10
1.3	DIE ZENTRALE ROLLE VON HIF-1 $\alpha$ , SEINE STRUKTUR UND FUNKTION ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR.....	12
1.3.1	<i>Die Relevanz von Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) für Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis .....</i>	<i>14</i>
1.4	ZYTOKINE ALS LOKALE IMMUNREGULATOREN .....	15
1.4.1	<i>Zell-Zell-Kontakt, Zytokinproduktion und Autoimmunerkrankung .....</i>	<i>15</i>
1.4.2	<i>IL-1<math>\beta</math>.....</i>	<i>16</i>
1.4.3	<i>IL-2.....</i>	<i>16</i>
1.4.4	<i>IL-6.....</i>	<i>17</i>
1.4.5	<i>IL-8.....</i>	<i>18</i>
1.4.6	<i>IL-10.....</i>	<i>18</i>
1.4.7	<i>TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	<i>19</i>
1.4.8	<i>MCAF.....</i>	<i>20</i>
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
2.1	PRÄPARATION HUMANER CD4 <sup>+</sup> ZELLEN .....	21
2.2	MESSUNG DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS MITTELS CLARK-ELEKTRODE.....	23
2.3	BESTIMMUNG DER ATP-MENGE .....	25
2.4	HIF-1 $\alpha$ NACHWEIS MITTELS WESTERNBLOT .....	26
2.5	BESTIMMUNG DER KONZENTRATIONEN VON TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 UND MCAF AUS DEN ÜBERSTÄNDEN.....	28
2.6	AUFARBEITUNG DER RNA UND UMSCHREIBEN IN CDNA.....	29
2.6.1	<i>Präparation der total RNA.....</i>	<i>29</i>
2.6.2	<i>Light Cycler Realtime PCR im Sybr Green Format.....</i>	<i>31</i>
2.7	KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG DER PCR PRODUKTE .....	33
	<i>Sequenzierung .....</i>	<i>34</i>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
3.1	KINETIK DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS VON PMA- / IONOMYCIN-STIMULIERTEN CD4 <sup>+</sup> ZELLEN.....	36
3.2	ERGEBNISSE DER QUANTIFIZIERUNG VON ATP.....	38
3.3	ÜBERLEBENSRATE DER ZELLEN UNTER VERSCHIEDENEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN.....	39
3.4	WESTERNBLOT ZUR DARSTELLUNG VON HIF-1 $\alpha$ .....	40
3.5	MESSUNG DER ZYTOKINKONZENTRATIONEN MITTELS MULTIPLEX-ELISA.....	42

## Inhaltsverzeichnis

3.6	LIGHT CYCLER PCR FÜR SUPEROXIDDISMUTASE1, HEXOKINASE UND $\beta$ -AKTIN .....	50
3.7	KORRELATIONSANALYSEN.....	58
3.7.1	<i>Experimente mit glukosehaltigem Medium .....</i>	<i>58</i>
3.7.2	<i>Experimente mit glukosefreiem Medium .....</i>	<i>59</i>
4	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
4.1	VERHALTEN VON CD4 <sup>+</sup> -ZELLEN IN UNTERSCHIEDLICHEN SITUATIONEN .....	61
4.1.1	<i>Verhalten von CD4<sup>+</sup>-Zellen bei Normoxie im glukosehaltigen Medium unter Stimulation.....</i>	<i>61</i>
4.1.2	<i>Auswirkungen von Hypoxie in glukosehaltigem Medium unter Stimulation .....</i>	<i>63</i>
4.1.3	<i>Auswirkungen von Glukosemangel unter Normoxie .....</i>	<i>69</i>
4.1.4	<i>Verhalten bei Glukosemangel und Hypoxie .....</i>	<i>72</i>
4.1.5	<i>Ausblick.....</i>	<i>74</i>
4.2	REGULATION DER EXPRESSION VON ZIELGENEN .....	76
4.2.1	<i>Hexokinase (Typ 1) .....</i>	<i>76</i>
4.2.2	<i>Superoxiddismutase-1 (Cu/Zn).....</i>	<i>79</i>
4.3	DISKUSSION ZUR KORRELATIONSANALYSE.....	82
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>

### 1 Einleitung

Der menschliche Körper stellt ein komplexes Netzwerk an überlebenswichtigen Prozessen dar. Effektoren dieses Zusammenspiels sind die Zellen. Spezialisiert auf unterschiedliche Funktionen müssen sie sich an die lokal herrschenden Bedingungen anpassen und diese aktiv modifizieren. Die für das Überleben und die Funktion der Zellen elementaren Umweltfaktoren sind Glukose und Sauerstoff. Ihre Verfügbarkeit sorgt für eine reibungslose Funktion in allen Zelltypen. Die Konkurrenz um diese und andere Umweltressourcen mit anderen Organismen hat evolutionär zur Ausbildung eines aktiven Schutzmechanismus gegen Nahrungskonkurrenten geführt, dem Immunsystem. Das Eindringen eines Pathogens in den Körper löst eine Reaktion aus, die darauf abzielt, dieses zu beseitigen, Ressourcen zu schützen und die Weitergabe genetischer Informationen an die nächste Generation zu gewährleisten. Entzündungsprozesse als Reaktion auf ein Pathogen zeichnen sich durch die vier Merkmale Überwärmung, Schwellung, Rötung und Schmerz aus. Es bildet sich lokal eine Hyperämie mit verlangsamtem Blutfluss und ein durch Histamin verursachtes Ödem, das bei Gefäßeinengung den Abtransport von Metaboliten und Kohlendioxid erschwert. Nimmt dieser Prozess einen chronischen Verlauf, wie bei dem Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis, so bildet sich lokal ein relativer Sauerstoff- und Glukosemangel. Im Rahmen dieses Krankheitsbildes beeinflussen Lymphozyten als pathogenetische Einflussfaktoren das Ausmaß dieser Erkrankung. Die Forschung zur Rheumatoiden Arthritis konzentriert sich auf die Funktion dieser Zellen und ihrer Produkte, welche als Signaltransduktoren in Form von Zytokinen vorliegen oder als Rezeptormoleküle zur Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems imponieren. Als eine wichtige Population unter den Lymphozyten wird in diesem Zusammenhang die Gruppe der Lymphozyten angesehen, die das Oberflächenmolekül CD4 tragen. Aus diesem Grunde steht die Untersuchung dieser Zellen in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund. Sie befasst sich mit der Wirkung von Glukose- und Sauerstoffmangel auf CD4<sup>+</sup>-Zellen, einer speziellen Population der Immunzellen des Körpers. Es sollte die Frage geklärt werden, wie sich diese Zellen verhalten, wenn man sie in einer hypoxischen Umgebung über längere Zeit inkubiert, was einer Nachahmung der oben genannten *in vivo* Verhältnisse entsprach. Glukose diente hierbei als Energielieferant zur Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) über die Glykolyse oder, in Kombination mit Sauerstoff, über die oxidative Phosphorylierung. Charakteristisch für eine hypoxische Umgebung ist der Nachweis von HIF-1 $\alpha$ , einem bei Sauerstoffmangel stabilisierten Protein in den Zellen. Messungen der ATP-Bilanz, der Zytokinproduktion und der Wirkung auf die Transkription zweier Schlüsselenzyme für die



Glykolyse und den Radikalstoffwechsel sollten Aussagen über das Energiemanagement der Zellen und die Beeinflussung der Zellfunktionen durch Glukose- und Sauerstoffmangel liefern. Die folgenden Abschnitte dieses Einleitungskapitels erläutern die genannten Faktoren und Messvariablen näher.

### **1.1 Das Immunsystem und Unterscheidungsmerkmale für verschiedene T-Lymphozyten**

Das Immunsystem lässt sich in die zelluläre und die humorale Komponente einteilen. Das Komplementsystem und die zu Plasmazellen ausdifferenzierten, Antikörper produzierenden B-Lymphozyten stellen die Stützpfiler der humoralen Immunität dar. T-Lymphozyten hingegen stehen als Haupteffektorzellen der zellulären Immunität im Vordergrund. Allen T-Lymphozyten gemeinsam ist die Expression des T-Zellrezeptors (TCR) auf ihrer Oberfläche. Ein für die Signalweiterleitung verantwortlicher Abschnitt dieses Rezeptors ist auch unter der Oberflächenmarkerbezeichnung CD3 bekannt. Zusätzlich zum T-Zellrezeptor gibt es noch weitere, die einzelnen Subpopulationen der T-Lymphozyten differenzierende Oberflächenmarker, wie die zwei verschiedenen MHC-Klassen bindenden Adhäsionsmoleküle CD4 und CD8. Entwicklungsbedingt gibt es die Möglichkeit, dass T-Lymphozyten entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren ( $CD4^+CD8^-$  oder  $CD4^-CD8^+$ ) oder beide Marker gleichzeitig aufweisen ( $CD4^+CD8^+$ -Lymphozyten).  $CD4^+CD8^-$ -Lymphozyten lassen sich auf der Basis ihres Zytokinprofils weiter in  $T_H1$ -Zellen und  $T_H2$ -Zellen aufgliedern.  $T_H1$ -Zellen sind durch die Expression von Interleukin-2, Interferon- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor- $\beta$  gekennzeichnet, während  $T_H2$ -Zellen IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 produzieren. Beide Gruppen können aus einer Population naiver T-Zelle hervorgehen und stellen zwei unterschiedliche Polarisierungen dar.  $T_H1$  Zellen entstehen durch den Einfluss von IL-12 auf naive T-Zellen. Lymphozyten des  $T_H2$ -Typs entwickeln sich aus den naiven T-Zellen durch die Bindung von IL-4. Die typischen Zytokine der  $T_H1$ -Population werden besonders bei autoimmunbedingten Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose gefunden, während Erkrankungen mit einer allergischen Genese einen Überschuss an Zytokinen aus der  $T_H2$  Gruppe aufweisen. Es existiert das Phänomen, dass mit zunehmendem Alter des Individuums die Polarisierung naiver T-Zellen in Richtung  $T_H1$  Populationen erfolgt. Dies könnte eine Ursache für das Verschwinden von atopischen Krankheitsbildern mit zunehmendem Lebensalter sein (1).  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen ist gemeinsam, dass sie für ihre Aktivierung und Proliferation den Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) benötigen. Diese APC präsentieren den T-Lymphozyten

## Einleitung

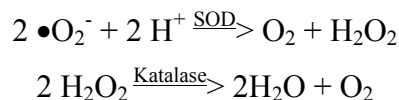
das Antigen gebunden an einen MHC-II Komplex in Kombination mit einem kostimulatorischen Molekül (CD80/86). Die über den MHC-II Komplex präsentierten Antigene sind im wesentlichen extrazellulären Ursprungs.  $T_H1$  Zellen sind in der Lage, über das Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) Makrophagen zu aktivieren, welche körperfremde oder zur Vernichtung markierte Zellen phagozytieren und die prozessierten Antigene wiederum auf ihrer Oberfläche über MHC-II als antigenpräsentierende Zelle (APC) zeigen.  $CD4^+CD8^+$ -Lymphozyten hingegen werden über das Erkennen von MHC-I gebundenem Antigen auf allen Körperzellen unter Zytokineinfluss der  $T_H1$  Zellen zur Proliferation angeregt. Die über MHC-I präsentierten Antigene sind Fragmente von intrazellulär produzierten Proteinen, die als fremd erkannt werden, wenn sie viralen oder entarteten Ursprungs sind. Eine Aktivierung dieses Zelltyps hat die Einleitung des programmierten Zelltodes der präsentierenden Zelle zur Folge. Auf diese Weise werden virale oder durch Entartung von Körperzellen hervorgerufene Gewebsschäden begrenzt.  $T_H2$  Zellen sind hingegen hauptsächlich für die Aktivierung von B-Lymphozyten verantwortlich und regen diese zur Ausdifferenzierung zu Plasmazellen mit einer spezifischen Antikörperproduktion an (2).

### **1.2 Die Energieversorgung der Zelle, Entstehung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die funktionelle Bedeutung von Adenosintriophosphat (ATP)**

Die Energieversorgung in allen eukaryoten Zellen ist durch zwei miteinander gekoppelte, jedoch auch eigenständig funktionierende Stoffwechselwege zur ATP Produktion charakterisiert. Dies ist zum einen die Glykolyse, welche als phylogenetisch ältestes, da in Pro- und Eukaryoten vorkommendes, System angesehen wird. Sie funktioniert unter sauerstoffreichen und sauerstoffarmen Bedingungen. Zum anderen dient die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), welche nur in den Mitochondrien eukaryotischer Zellen vorkommt, zur Synthese von ATP. Sie erfordert das unbedingte Vorhandensein von Sauerstoff. Beide Systeme sind über den Zitratzyklus miteinander verbunden, der als zentraler Kreislauf für die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die oxidative Phosphorylierung aus der Glykolyse und aus der Verwertung von glukoplastischen Aminosäuren verantwortlich ist. Die Effizienz beider ATP liefernder Prozesse ergibt sich aus der Menge ATP pro Mol eingesetzter Glukose, und ist bei der oxidativen Phosphorylierung mit maximal 34 mol ATP pro mol Glukose bei weitem größer als bei der anaeroben Glykolyse mit 2 mol ATP pro mol Glukose. Der Nachteil dieser hohen Effizienz ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette. Zu den ROS gehören Moleküle wie Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ), Ionen wie das

## Einleitung

Hypochlorid-Ion ( $\text{OCl}^-$ ), Radikale wie das Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) und Mischformen wie das Superoxid-Anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ). Diese Radikale sind für Schädigungen von Zellmembranen verantwortlich, da sie die Fettsäureseitenketten der Membranlipide über verschiedene Zwischenstufen kovalent verknüpfen und somit deformieren. Dies führt im Falle der Mitochondrienmembran zu Funktionsverlusten der Atmungskette, im Falle der Zellmembran zu Beeinträchtigungen in der rezeptorassozierten Signaltransduktion. Werden die Membranen des endoplasmatischen Retikulums oder des Golgiapparates geschädigt, sind die Proteinsynthese und die Glykolyse beeinträchtigt. Als Schutz gegen die Wirkung der ROS gibt es enzymatische Protektionsmechanismen wie die Superoxiddismutase (SOD) und die Katalase. Mit ihrer Hilfe werden die entstandenen Radikale in folgender Reaktionskette unschädlich gemacht:



Ihre aggressive Wirkung auf Zellmembranen wird von Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten jedoch auch dazu verwendet, phagozytiertes Material wie beispielsweise Bakterien zu zerstören. Hierzu synthetisieren Makrophagen mit Hilfe des Enzyms NADPH-Oxidase in speziellen Zellkompartimenten, Phago-Lysosomen genannt, Superoxid-Anionen. Neutrophile Granulozyten haben darüber hinaus die Fähigkeit, mit Hilfe des Enzyms Myeloperoxidase aus Wasserstoffperoxyd Hypochlorid-Ionen ( $\text{OCl}^-$ ) zu erzeugen, welche als stark antiseptisch wirkende Substanzen Bakterienmembranen oxidieren. Da es sich bei den  $\text{CD4}^+$ -Lymphozyten nicht um phagozytierende Zellen handelt, steht bei der Betrachtung der SOD ihre protektive Funktion für die eigenen Zellmembranen im Vordergrund.

ATP dient in der Zelle als Energiespeicher, auf den ein rascher Zugriff möglich ist. Die im Triphosphat enthaltene Energie wird in einem exergonen Prozess mittels hydrolytischer Abspaltung des dritten Phosphatrestes durch Phosphatasen freigesetzt. Sie wird verwendet, um Ionenpumpen anzutreiben, Proteine zu synthetisieren, um für Phosphorylierungsreaktionen Ausgangsmaterial und Energie bereitzustellen, sowie für alle energieabhängigen Prozesse in der Zelle. ATP dient aber auch extrazellulär als Mediator von Immunfunktionen. So ist zum Beispiel die lytische Aktivität von NK-Zellen durch ATP, welches extrazellulär wirkt, negativ beeinflussbar (3). Auf aktivierten Lymphozyten sind ATP bindende Enzyme wie Ecto-

nucleosid-triphosphat-diphosphohydrolase (Ecto-NTPDasen) exprimiert. Man kann auch purinerge Rezeptoren für ATP finden, von denen es Ionenkanal-assoziierte (P2X) und G-Protein gekoppelte (P2Y) gibt. Durch Depletion von extrazellulärem ATP und Blockade von Ecto-NTPDasen lassen sich beispielsweise die Transkription von IL-2 mRNA und die Interferon- $\gamma$  Sekretion hemmen. Des weiteren werden auch intrazelluläre T-Zell-Rezeptor vermittelte Kalziumströme durch extrazelluläres ATP beeinflusst (4). Im Zusammenhang mit der Energiegewinnung ist ein Effekt zu nennen, der bei malignen Zellen beobachtet wurde. Dies ist der Warburg-Effekt, nach welchem maligne Zellen trotz guter Oxygenierung bei ausreichendem Angebot von Glukose den aerob-glykolytischen Weg der Energiegewinnung bevorzugen. Dieser ist im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung weit weniger effizient. Ursache hierfür ist möglicherweise eine autonome Glukoseaufnahme durch die malignen Zellen, welche zu einer kontinuierlichen Beanspruchung der glykolytischen Kaskade führt (5). Des weiteren gibt es noch zwei andere bei Mikroorganismen verbreitete Effekte, welche die Zusammenhänge der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung betreffen. Zum einen ist hier der Pasteur-Effekt zu nennen. Darunter versteht man, dass Zellen durch die Versorgung mit Sauerstoff in ihrem Umsatz von Glukose reguliert werden. Bei hohem Sauerstoffangebot wird die glykolytische Aktivität zu Gunsten der oxidativen Phosphorylierung gebremst. Zum anderen wird ein weiterer Regulationsmechanismus durch den Crabtree-Effekt beschrieben. Er besagt, dass eine hohe Glykolyserate die oxidative Phosphorylierung hemmt.

### **1.3 Die zentrale Rolle von HIF-1 $\alpha$ , seine Struktur und Funktion als Transkriptionsfaktor**

HIF (Hypoxia Inducible Factor) ist ein zentrales Protein in allen Zelltypen, welches für die Regulation von Zellfunktionen zuständig ist, die der Zelle den adäquaten Umgang mit einer hypoxischen Umgebung ermöglichen. Hierzu zählen Einflüsse auf folgende Enzyme der Glukoseverwertung:

Hexokinase-1 und 2, Phosphofructokinase-L, Aldolase-C, Triosephosphatisomerase, Pyruvatkinase-M, Laktatdehydrogenase-A, Enolase-1 und der Glukosetransporter-1 (6). HIF dient aber auch zur Regulation der Transkription von VEGF als Aktivator der Angiogenese. VEGF wird von T-Lymphozyten im Entzündungsgebiet produziert und trägt neben seinem Einfluss auf die durch Endothelzellen initiiierbare Angiogenese auch zur proinflammatorischen T-Lymphozyten-Differenzierung durch Erhöhung der IFN- $\gamma$

## Einleitung

Expression in T-Zellen bei. Gleichzeitig wird durch VEGF die IL-10 Produktion herunterreguliert und somit ein wichtiger anti-inflammatorischer Faktor ausgeschaltet (7). Im Eisenstoffwechsel spielt HIF ebenfalls eine entscheidende Rolle durch die Regulation von Coeruloplasmin, von Transferrin und seinem Rezeptor wie auch im Matrixstoffwechsel durch einen Einfluss auf die Expression von Prolyl-4-hydroxylase- $\alpha$  und Kollagen Typ V (8-12). Entdeckt wurde der Faktor jedoch durch seine Wirkung auf die Erythropoietinproduktion von Leber und Nierenzellen. Erythropoietin ist für die Produktion von neuen Erythrozyten im Knochenmark als Sauerstofftransporter für den Kreislauf verantwortlich (13). Das HIF-1 Protein wurde erstmals 1995 von Wang et al. kloniert und sequenziert. Hier zeigten sich zwei Untereinheiten, HIF-1 $\alpha$  mit 120 kDa (bis dato unbekannt) und HIF 1 $\beta$  mit 91-94 kDa (vormals auch als ARNT (Aryl-Hydrocarbon receptor nuclear translocator) bekannt). In der Proteinstruktur findet sich eine sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODD), die für den Abbau des Faktors unter normoxischen Bedingungen im Proteasomenkomplex der Zellen verantwortlich ist. Erst ab einer Sauerstoffsättigung von weniger als 6% beginnt die Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ . Bei einem derart niedrigen Sauerstoffangebot gelingt es den eisenabhängigen Prolyl-4-hydroxylasen nicht mehr, die Proline an Position 402 und 564 innerhalb der ODD zu oxidieren, um Hydroxylgruppen für eine Bindung an pVHL (product of von Hippel-Lindau gene) herzustellen. Dadurch wird eine unmittelbare Ubiquitinierung und der folgende Abbau des Faktors im 26S-Proteasomenkomplex verhindert (14). Somit gelten die Prolyl-4-hydroxylasen als intrazellulärer Sauerstoffsensor in vielen Zelltypen. Dauert die Hypoxie an, findet sich HIF-1 $\alpha$  schon nach ungefähr einer Stunde im Zellkern, wo es mit HIF-1 $\beta$  dimerisiert und an die Bindungsstelle für HIF (HBS) der verschiedenen von ihm beeinflussten Gene bindet. HIF benötigt jedoch Kostimulatoren um die Transkription der Zielgene zu initiieren. Bei den Genen, die für Transferrin, Phosphoglyceratkinase I, Insuline-like-growth-factor-binding-protein oder Glukosetransporter-1 kodieren, reicht auch ein Multimer von verschiedenen HIF Bindungsdomänen zur Transkription aus. Dies bedeutet, wenn HIF-1 in ausreichender Menge im Kern vorhanden ist, werden diese Gene auch ohne Kostimulatoren transkribiert.

Neben der Hypoxie sind auch verschiedene Zytokine in der Lage sogar unter Normoxie die HIF-1 $\alpha$  Stabilisierung und die Translokation in den Zellkern zu bewirken. Unter ihnen sind IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , PDGF, FGF-2 und der Insuline-like-growth-factor. Sie binden an mit Tyrosinkinasen verbundenen Rezeptoren (RTK) und bewirken die Stimulation des PI-3K/Akt-kinase/FRAP-Weges, welcher die Translation von HIF-1 $\alpha$  verstärkt (15).

Die rezeptorgebundenen Tyrosinkinasen aktivieren jedoch auch die RAF/MEK/MAP-Kinase-Kaskade, so dass über diesen notwendigen Weg HIF-1 $\alpha$  phosphoryliert wird und in den Kern gelangen kann. Im Gegensatz zum ersten Weg zeichnet sich der zweite durch ein Fehlen des Einflusses auf die Translation von HIF-1 $\alpha$  selbst aus.

### **1.3.1 Die Relevanz von Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) für Autoimmunerkrankungen am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis**

Die Rheumatoide Arthritis (RA) stellt sich als eine chronisch inflammatorische Erkrankung der Gelenke mit hyperplastischer, invasiv wachsender, die Knochen- und Knorpelsubstanz zerstörender Synovialschleimhaut dar. Diese ist von den verschiedenen Immunzelltypen infiltriert. Lokal zeigt sich eine Ansammlung von Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten und eine ebenfalls lokale Erhöhung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Konzentration. Bei dieser Erkrankung zeigen im Mittel 50% der Synoviozyten eine starke HIF-1 $\alpha$ -Produktion, während bei Synovialgewebe von Normalspendern nur bis zu 20 % der Synoviozyten HIF-1 $\alpha$  positiv sind (16).

Aufgrund der erhöhten IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Konzentration ist eine durch diese beiden Zytokine verstärkte HIF-1 $\alpha$ -Synthese über die im Kapitel 1.3 beschriebenen Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren und den mit ihnen verbundenen Signalkaskaden möglich. So konnte ein Zusammenhang zwischen TNF- $\alpha$  Rezeptorbindung und einer verstärkten Expression von funktionell aktivem, jedoch im Gegensatz zu Hypoxie ubiquitiniertem HIF1- $\alpha$  über einen NF $\kappa$ B-abhängigen Mechanismus hergestellt werden. Dies ist jedoch bisher nur an Nierenzellen der Linie HEK293 und an Proximaltubuluszellen (LLC-PK<sub>1</sub>) gezeigt worden (17). Diese erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Expression führt unter anderem zu einer verstärkten lokalen Präsenz von VEGF, das hauptsächlich von Makrophagen exprimiert wird und somit zu einer erhöhten Angiogenese. Dies erklärt auch die beobachtete Zunahme der Dichte von mikrovaskulären Strukturen im hyperplastischen Synovialgewebe (Pannus) von RA-Patienten (18). Studien mit Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern haben ergeben, dass die Expression von VEGF, IL-1, IL-6 und IL-8 durch TNF- $\alpha$  gesteuert wird. RA-Patienten unter Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie zeigten demzufolge eine erniedrigte VEGF-Konzentration im Serum im Vergleich zu unbehandelten Patienten. Frisch gewonnenes Synovialgewebe von RA Patienten reagierte in Kultur auf die Gabe von Anti-TNF- $\alpha$  nur in Kombination mit Anti-IL-1 mit einer Halbierung der VEGF-Produktion (19).

Alle genannten Befunde lassen auf eine Verbindung zwischen TNF- $\alpha$  über die

Rezeptortyrosinkinasen mit der Regulation von HIF 1- $\alpha$  und dessen regulierenden Einfluss auf die VEGF-Synthese schließen, welche zu einer verstärkten Vaskularisation des hyperplastischen Synovialgewebes führt und somit den destruktiven Prozess der Invasion des Knorpel- und Knochengewebes durch den Pannus unterhält.

### **1.4 Zytokine als lokale Immunregulatoren**

#### **1.4.1 Zell-Zell-Kontakt, Zytokinproduktion und Autoimmunerkrankung**

T-Lymphozyten wandern, angelockt durch im Entzündungsgebiet befindliche polymorphkernige Neutrophile und Makrophagen, in das geschädigte Gebiet ein. Dort treffen sie aufeinander und gehen direkte Zell-Zell-Interaktionen ein. Diese Kontakte zwischen aktivierten T-Lymphozyten und Makrophagen führen zur vermehrten Ausschüttung von IL-1 $\beta$  durch letztere Zellen. Diese IL-1 $\beta$  Ausschüttung durch Makrophagen ist auch durch alleinige Gabe von LPS induzierbar. Hierbei ist kein Zellkontakt zu T-Lymphozyten nötig. Bei Entzündungsprozessen ohne exogene Ursache, wie der Rheumatoiden Arthritis oder der Multiplen Sklerose, stellt der Zell-Zell-Kontakt zwischen Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten (experimentell PHA/PMA oder Anti-CD3/Anti-CD28 bzw. spezifisches Antigen) und die daraus resultierende Expression von IL-1 $\beta$  jedoch die Hauptursache für die Ausbreitung der Entzündung dar.

Es ist noch unbekannt, welche Oberflächenmoleküle diese Zell-Zell-Interaktion im Einzelnen ermöglichen. Es konnte jedoch ein Einfluss von Therapeutika wie Leflunomid (Dihydroorotatdehydrogenasehemmer = Pyrimidinsyntheseinhibitor = Proliferationshemmer) und IFN- $\beta$  (u.a. Verstärkung der antiviralen Immunantwort durch NK-Zellen) auf diese wichtige Zell-Interaktion gezeigt werden (20). In den nun folgenden Abschnitten sollen die Zytokine als Mediatoren der Entzündungsreaktion näher beschrieben werden. Es wird hierbei besonders auf ihre speziellen Funktionen eingegangen. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 soll in diesem Zusammenhang näher beleuchtet werden. Manche Zytokine werden durch ihn reguliert, andere regulieren selbst die Stärke seiner funktionellen Aktivität. Dieses Wechselspiel zu verstehen bedeutet, einen tieferen Einblick in die Auswirkung von Hypoxie zu erlangen. In dieser Einleitung zu den Zytokinen werden die Funktionen des einzelnen Zytokins, seine chromosomale Lokalisation, die Auswirkungen von Mutationen und die Regulation durch andere Faktoren beschrieben.

### 1.4.2 IL-1 $\beta$

Interleukin-1 $\beta$  wird durch enzymatische Prozessierung durch Caspase-I aus einem IL-1 Vorläuferprotein gewonnen. Durch die enzymatische Prozessierung des gleichen Vorläuferproteins durch Calpain wird IL-1 $\alpha$  gebildet. Somit entstehen IL-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  aus einem Vorläuferprotein. Beide Produkte binden an den gleichen Rezeptor. IL-1 wird von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Endothelzellen und anderen Zelltypen produziert. In T<sub>H</sub>-Lymphozyten wirkt es bei deren Aktivierung mit und unterstützt die Produktion von IL-2 (21-23). In B-Zellen sorgt es für die Zellreifung und die klonale Expansion. In NK-Zellen steigert es die zytotoxische Aktivität. Auf Endothelzellen werden durch IL-1 mehr interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs) exprimiert. Auf andere Makrophagen und Neutrophile wirkt es als Chemoattraktant. In Leberzellen induziert IL-1 die Synthese von Akut-Phase Proteinen und im Hypothalamus ist es für die Induktion von Fieber verantwortlich. Insgesamt handelt es sich demnach bei IL-1 um ein pro-inflammatorisches Zytokin. IL-1 $\beta$  wird eine regulierende Rolle in der Stabilisierung und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  in einer von reaktiven Sauerstoffspezies abhängigen Form zugesprochen, allerdings ist dies bisher nur für fetale Alveolarepithelzellen des Typs II gezeigt worden (24).

### 1.4.3 IL-2

Interleukin-2 ist ein von aktivierten T<sub>H</sub>1-Zellen produziertes Protein, welches in T<sub>H</sub>-Zellen und in zytotoxischen T-Zellen (T<sub>c</sub>-Zellen), nach Kontakt mit einem Antigen, eine Proliferation bewirkt. Bei antigenspezifischen T-Zell-Klonen wird durch IL-2 das Wachstum über längere Zeiträume hinweg unterstützt. Es wirkt auf NK-Zellen aktivitätssteigernd und hat einen proliferativen Effekt auf B-Lymphozyten (25). Im selben Jahr der Klonierung des IL-2 Gens 1983 durch Taniguchi et al. stellte die Gruppe um Fujita fest, dass die Promotorregion dieses Gens Ähnlichkeiten zu der des Interferon-gamma Gens aufweist. Der Genlokus wurde 1984 von der Gruppe um Seigel auf dem q-Arm des Chromosoms 4 (4q27) identifiziert (26). Ein Defekt der IL-2 Transkription wurde in einem Fallbericht von Weinberg und Parkman beschrieben. Der Mangel an funktionellem IL-2 führte bei einem neugeborenen Jungen aus Salvador zum Krankheitsbild der schweren kombinierten Immundefizienz (SCID), welcher er nach zweimaliger Knochenmarkstransplantation in Folge einer hämorrhagischen Pankreatitis im Alter von 15 Monaten erlag. Das Krankheitsbild bei diesem Patienten wurde durch eine Hepatomegalie, niedrige Serum IgG-, IgM- und IgA-Konzentrationen, einen schmerzhaft,



juckenden erythematösen Hautausschlag sowie perirektale Moniliasis (Soor) bestimmt. Seine T-Lymphozyten waren nicht in der Lage, auf Stimulation hin mit einer IL-2 Ausschüttung und Proliferation zu reagieren. Erst unter Zugabe von rekombinanten IL-2 war dieser Defekt der Proliferationshemmung *in vitro* behebbar (27). 1998 entdeckte die Gruppe um Hollander einen sehr interessanten Aspekt in der Regulation der IL-2 Gentranskription. Die Forscher fanden eine an nur eines der zwei IL-2 Genallele gebundene Genexpression. Sie vermuteten in diesem Mechanismus eine strikte Regulation der Genexpression basierend auf der Tatsache, dass die Überexpression von IL-2 durch T-Zellen zur Aufhebung von Anergie autoreaktiver T-Zellen führen kann (28, 29).

### 1.4.4 IL-6

Interleukin-6 wird von Monozyten, Makrophagen, T<sub>H</sub>2-Zellen und Stromazellen des Knochenmarks gebildet. Bei proliferierenden B-Zellen leitet es die terminale Differenzierung zu Plasmazellen ein. Bei Plasmazellen erhöht es die Antikörperproduktion. In Stammzellen des Knochenmarks fördert IL-6 die Differenzierung, und in Leberzellen sorgt es für die Synthese von Akut-Phase Proteinen. Bei T-Zellen ist es in Synergie mit IL-1 für eine vermehrte IL-2 Produktion verantwortlich (30). Der Genlocus für IL-6, auch bekannt unter dem Namen Interferon- $\beta$ -2, befindet sich auf dem p-Arm von Chromosom 7 (7p15.3) (31). Bei Patienten mit Juveniler Rheumatoider Arthritis wird IL-6 in Verbindung mit den bei dieser Erkrankung typischen, in der akuten Phase regelmäßig auftretenden, nächtlichen Fieberschüben gebracht. Als mögliche Ursache zeigte sich hier ein Polymorphismus, der sich an Position 174 bp vor dem Genstart befindet, und durch einen Basenaustausch von Cytosin (C) durch Guanin (G) charakterisiert ist. Während bei Patienten mit Juveniler Rheumatoider Arthritis der G-Polymorphismus gehäuft auftritt, ist bei der Vergleichsgruppe der protektive C-Polymorphismus vorhanden (32).

Chronisch erhöhte IL-6-Niveaus werden mit der Osteoporose in Verbindung gebracht. Auch bei Patienten mit Morbus Paget, einer Stoffwechselerkrankung mit besonders stark erhöhtem Knochenumbau, finden sich signifikant erhöhte IL-6-Werte in Serum und Knochenmark betroffener Knochen. Diese Erkrankung zeichnet sich durch sehr große, multinukleäre Osteoklasten aus. IL-6 wird hierbei für die abnorme Aktivitätssteigerung der Osteoklasten verantwortlich gemacht. Bei dieser Erkrankung erfolgt ein schneller Knochenabbau durch Osteoklasten, der parallel zu einem schnellen Knochenaufbau durch Osteoblasten stattfindet. Dieser Aufbau ist aber qualitativ nicht ausreichend und es ergibt sich hieraus eine Verminderung der Belastbarkeit des Knochens und somit eine erhöhte Frakturhäufigkeit. Als

möglicher Auslöser dieser Erkrankung wird eine Infektion mit Paramyxoviren angenommen (33).

### 1.4.5 IL-8

IL-8 ist der Prototyp eines CXC-Chemokins und wird vorrangig von Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen synthetisiert. In CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bewirkte eine Kombination aus PMA- und Ionomycin-Stimulation eine Vermehrung der mRNA für IL-8, jedoch wurde die Ausschüttung von IL-8-Polypeptid in den Experimenten von Smyth et al. nicht beobachtet. Dies wurde als Blockierung der IL-8 Produktion auf posttranskriptioneller Ebene interpretiert (34). In neueren Experimenten konnte jedoch eine Sekretion von IL-8 unter PHA Stimulation gezeigt werden (35). IL-8 wirkt auf Neutrophile als Chemoattraktant und fördert die Adhäsion an vaskuläres Endothel durch Induktion von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche sowie die Extravasion (das Verlassen des Blutstromes durch die Gefäßwand) in das betroffene Gewebe. Außerdem verstärkt es die Freisetzung lysosomaler Enzyme durch Neutrophile und initiiert den respiratorischen Burst. *In vitro* wurde eine Chemotaxis für CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten festgestellt. IL-8 wird von einigen sehr aggressiven Melanomarten unter dem Einfluss von Hypoxie gebildet, um eine Neovaskularisation zu induzieren. Dieser Prozess scheint von der Präsenz der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB abhängig zu sein (36). Es konnte gezeigt werden, dass die IL-8-Expression ohne den Transkriptionsfaktor NFκB in allen untersuchten Zelltypen nicht möglich ist, und dass NFκB wiederum durch das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert wird (37).

### 1.4.6 IL-10

Interleukin-10 wird von T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-Zellen, Monozyten und B-Lymphozyten exprimiert und vermindert die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in T-Zellen und Monozyten (IL-1α und IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF, G-CSF) (38).

Wichtige kostimulatorische Moleküle wie ICAM (CD54), CD80 und CD86 zur Aktivierung von T-Lymphozyten werden ebenfalls in ihrer Expression durch IL-10 negativ beeinflusst (39). Auf antigenpräsentierenden Zellen wird unter Einfluss von IL-10 die Expression von MHC-II Molekülen gesenkt und somit eine Antigenpräsentation erschwert. Bei reinen CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozytenkulturen hat IL-10 einen suppressiven Effekt auf die IL-2- und TNF-α-Produktion (40). Bei aktivierten B-Lymphozyten hingegen bewirkt der Kontakt mit IL-10

eine Proliferation und Ausdifferenzierung zu Antikörper produzierenden Plasmazellen. Auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hat IL-10 einen stimulatorischen Effekt (41). Auf T-Zelltypen, welche unter IL-2 Mangel innerhalb von wenigen Tagen Apoptose begehen, hat IL-10 einen anti-apoptotischen Einfluss (42). Der Genlokus von Interleukin 10 wurde 1997 von Eskdale et al. auf den q-Arm des Chromosoms 1 eingegrenzt. (1q31-32) (43). In Autoimmunerkrankungen wie RA und Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) zeigen sich chronisch erhöhte IL-10 Serumkonzentrationen. 2001 konnten Gibson et al. zeigen, dass bestimmte Polymorphismen von Einzelbasen (SNP) in der Promotorregion des IL-10-Gens in Verbindung mit einer höheren Anfälligkeit für SLE gebracht werden können (44). Ein bestimmtes Allel des IL-10-Gens (IL10.G13) wird mit einer erhöhten Anfälligkeit für Psoriasis in Verbindung gebracht. Bei diesen Patienten zeigte sich eine positive Familienanamnese, ein frühes Einsetzen der Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr und eine erhöhte Symptomausprägung bei verminderter IL-10 Produktion (45). In einer kleinen Studie an 50 RA-Patienten unter Monotherapie mit Etanercept (TNF $\alpha$ -Antagonist) konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem R3-Allel in der Promotorregion des IL-10 Gens besser auf die Therapie im Vergleich zu G13 Allelträgern ansprachen (46). IL-10 kann durch sein Wirkungsprofil in die Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokine eingeordnet werden.

### 1.4.7 TNF- $\alpha$

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  wird hauptsächlich von Makrophagen und T-Lymphozyten gebildet. Auf Tumorzellen hat dieses Protein einen zytotoxischen Effekt. Bei Entzündungszellen wirkt es induktiv auf die Zytokinproduktion und ist für die Tumorkachexie verantwortlich. In Endothelzellen verursacht TNF- $\alpha$  die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise E-Selektin. T-Lymphozyten werden durch vermehrte Wasserstoffperoxydkonzentration zur Produktion von TNF- $\alpha$  angeregt (47). In Fibroblasten und Synoviozyten von RA-Patienten regt TNF- $\alpha$  die Produktion von Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Kollagenasen an (48). Über die Aktivierung von Osteoklasten ist TNF- $\alpha$  mitverantwortlich für die Knochendestruktion bei der RA. Die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  erfolgt von allen untersuchten Zytokinen am schnellsten. Erhöhte TNF- $\alpha$  Serumspiegel fanden sich im von Black et al. verwendeten Mausmodell bereits 30 Minuten nach Einwirken eines Stressfaktors. Dies bedeutet, dass TNF- $\alpha$  die Initiation der Entzündungskaskade bewirkt und somit den Ablauf und das Ausmaß der Entzündungsprozesse beeinflusst. Diese schnelle Nachweisbarkeit von TNF- $\alpha$  im Serum entsteht im Ergebnis der Wirkung des TNF- $\alpha$ -

Konversionsenzym (TACE), welches membrangebundenes präformiertes TNF- $\alpha$  auf neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten durch enzymatische Abtrennung freisetzt. Auf diese Weise kann unmittelbar lokal auf einen Stimulus reagiert und der Zeitraum zur de novo Synthese des Faktors überbrückt werden (49). Durch Spies et al. wurde 1986 die Lage des TNF $\alpha$ -Gens auf dem p-Arm des Chromosoms 6 nachgewiesen (6p21.3-21.1) und eine Verbindung zu den MHC-Genloci hergestellt (50). Interessanterweise befindet sich das Gen für TNF- $\beta$  nur 1-2kb entfernt vom TNF- $\alpha$  Gen. Beide liegen zwischen dem C2-Lokus von HLA-III und dem HLA-B-Lokus der Klasse I (51).

### 1.4.8 MCAF

*Monocyte-Chemotactic-and-Activation-Factor*, auch MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*) genannt, ist der Prototyp eines CC-Chemokins und wurde bei LPS stimulierten Monozyten erstmals entdeckt. Wie auch IL-8 wirkt dieses Chemokin auf einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen. Während IL-8 als CXC-Chemokin jedoch vorrangig chemoattraktiv auf neutrophile Granulozyten wirkt, ist MCAF in erster Linie chemoattraktiv und aktivierend für Monozyten / Makrophagen und Lymphozyten. In Monozyten werden durch die Anwesenheit von MCAF mehr IL-1 und IL-6 gebildet. Des weiteren fördert MCAF in Monozyten einen respiratorischen Burst sowie die Freisetzung lysosomaler Enzyme. Außerdem werden durch MCAF nicht nur Monozyten / Makrophagen ins Entzündungsgebiet gelockt, sondern auch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. MCAF hat also auf Monozyten den gleichen Effekt wie IL-8 auf neutrophile Granulozyten (37). In fibroblastenähnlichen Synoviozyten (FLS) von Patienten mit Rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis (OA) bewirkt die Gabe von IL-2 und IL-1 $\beta$  eine vermehrte Produktion von MCAF. Dies wird als einer der Mechanismen zur Rekrutierung von Makrophagen und T-Lymphozyten in die Synovialmembran angesehen. Die Wirkung von IL-2 auf die FLS wurde als Folge der Bindung von IL-2 an die  $\beta$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD122) erkannt. Die FLS von Patienten mit RA reagierten dabei signifikant stärker auf den IL-2-Stimulus, mit einer Erhöhung der MCAF-Produktion, als FLS von Patienten mit Osteoarthritis. Es wird also eine Kausalkette von IL-2 produzierenden T<sub>H</sub>1-Lymphozyten über die FLS zur Makrophagenrekrutierung in die Synovialmembran angenommen (52).

## 2 Materialien und Methoden

**Tabelle 1** Puffer- und Medienliste

<b>Puffer / Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
RPMI Kulturmedium mit / ohne Glukose	RPMI 1640; 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 0,1 % (v/v) 50mM $\beta$ -Mercaptoethanol $\pm$ 11,1 mM Glukose
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,6	80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 19mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 100 mM NaCl
Tris-buffered saline (TBS) pH 7,5	150 mM NaCl (Roth) ; 10mM Tris-HCl (Roth)
Blot-Stripping-Puffer pH 6,7	100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma M-625); 2%(w/v) SDS (Roth); 62,5 mM Tris-HCl (Roth)
TBS-Tween	Siehe TBS + 0,05% Tween 20 (Sigma P-1397)
Blottingpuffer pH 8,3	26mM Tris (Roth), 190mM Glycin (Roth), 20% (v/v) Methanol
PBS / BSA (Bovine serum albumin)	Siehe PBS + 1%(w/v) BSA
Ponceau-S Red	0,2% Ponceau-S red, 1% Essigsäure
5 x Laemmli Puffer pH 6,8	Bromphenolblau 100 mg; 3,5 mL Glycerin; 2,5 mL $\beta$ -Mercaptoethanol; 1,5 g SDS, 1 M Tris-HCl
Blocking-Lösung	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
ATP Zelllysispuffer pH 7,75	0,1 M Tris-HCl (Roth); 4 mM EDTA-acetat (Roth)

### 2.1 Präparation humaner CD4+ Zellen

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation von Leukozytenfilterspülungen gewonnen. Die hierfür benötigten Leukozytenfilter kamen aus der Blutspendezentrale der Charité. Sie waren nie älter als zwei Stunden nach Vollblutspende durch gesunde Blutspender. Zuerst wurden die Leukozytenfilter entgegen der Filterrichtung mit insgesamt 135 mL PBS/BSA und 25 mL Luft gespült. Die gewonnenen 160 mL Zellsuspension wurden auf vier 50 mL Falconröhrchen mit jeweils 15 mL Ficoll aufgeschichtet und anschließend bei Raumtemperatur und 2000 rpm (836 x g) in einer Heraeus Labofuge Zentrifuge für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, wobei der Rotor bis zum Stillstand weitere 17 Minuten benötigte. Danach wurden die PBMC von je zwei 50 mL Tubes mittels einer 1 mL Eppendorfpipette oder einer 10 mL Glaspipette mit Akkupipettierhilfe (Pipetus-akku, Hirschmann) von der Grenzschicht zwischen Ficoll und Zellsuspension in ein frisches 50 mL

Falconröhrchen überführt. Die zwei resultierenden 50 mL Röhrchen mit den PBMC Suspensionen wurden dann mit PBS/ BSA aufgefüllt und in einer Heraeus Labofuge 400R Zentrifuge bei 1200 rpm (280 g) mit Bremse 10 Minuten pelletiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und die zwei Pellets in je 720 µL PBS/ BSA resuspendiert. Um unspezifische Bindungen für die nachfolgend verwendeten Antikörper zu blocken, wurden je 80 µL Flebogamma (Grifols Deutschland GmbH, 50 mg/mL) hinzugegeben und die Suspension für 5 Minuten auf Eis ruhend belassen. Im folgenden wurden je 200 µL Anti-human-CD4-Microbeads der Firma Miltenyi hinzugegeben und die Suspension bei 12 °C für 15 Minuten belassen, um den mit magnetischen Partikeln konjugierten Antikörpern gegen die CD4-Regionen der Zelloberflächen die Möglichkeit zur Bindung zu geben. Um eine verstärkte Bindung der Antikörper an Monozyten zu verhindern, wurden die Zellsuspensionen nach 15 Minuten mit PBS/ BSA aufgefüllt und in der Heraeus Labofuge 400R Zentrifuge für 10 Minuten bei 1200 rpm (280 x g) gewaschen. Nach Resuspendierung in 2,5 mL PBS/ BSA wurden die so markierten Zellen unter Zugabe eines weiteren Milliliters PBS/ BSA mittels automatischer magnetischer Zellsortierung mit einem MACS-Automaten von Miltenyi durch positive Selektion (Programm Possel) von den unmarkierten Zellen getrennt. Die Trennung von den unmarkierten Zellen erfolgte über eine im Gerät befindliche Säule bei angelegtem Magnetfeld durch Spülen mit einem FACS Flow Puffer. Bei abgeschaltetem Magnetfeld wurden dann die markierten Zellen durch Spülen der Säule gewonnen. Zur Bestimmung der Reinheit der Zellpopulation sowie zur Viabilitätsmessung wurden 25 µL Zellkonzentrat (von insgesamt 4 mL) zur Analyse am FACS verwendet. Diese 25 µL Probe wurde zu einer vorbereiteten Lösung von 1 µL FITC-markiertem Anti-human-CD4-IgG (1:1000 Verdünnung in 100 µL Endvolumen) in 74 µL PBS/ BSA gegeben und für 10 Minuten auf Eis belassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 mL PBS/ BSA und das Waschen in einer Eppendorfszentrifuge (Heraeus Biofuge fresco) bei 4°C und 2300 rpm (502 x g) für 8 Minuten. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 400 bis 500 µL PBS/ BSA resuspendiert und unmittelbar vor der Messung am FACS mit Propidiumjodid (0,1 mg/mL) im Verhältnis 1:100 versetzt. Anhand der FITC markierten anti CD4<sup>+</sup>-Antikörper und der Propidiumjodidmarkierung ließen sich nun Reinheit und Viabilität der Zellpopulation bestimmen. Ab einer Reinheit von über 97% CD4<sup>+</sup>-Zellen und einer Viabilität von über 96% wurden die Zellen weiter verwendet, andernfalls verworfen. Parallel zur Färbung der 25 µL Probe für die FACS Messung wurde die gewonnene Zellsuspension mit dem jeweils für den aktuellen Versuch verwendeten Medium auf 15 mL aufgefüllt und in einer Heraeus Labofuge 400R Zentrifuge bei 1200 rpm (280 x g) und 4 °C für 10 Minuten gewaschen. Danach wurde

das entstandene CD4<sup>+</sup>-Zellpellet in 4,5 mL Medium resuspendiert und durch Messung einer 10 µL Probe dieser Suspension in 10 mL PBA mit einem Zytometer (CASY TT) die Zellkonzentration bestimmt. Nach der ersten Konzentrationsmessung wurde durch Zugabe von Medium zur Ausgangssuspension eine Zellkonzentration um  $4 \times 10^6$  Zellen pro mL eingestellt, was durch erneute Messung einer 10 µL Probe überprüft wurde. Enthielten die 4,5 mL Ausgangssuspension weniger als  $1,7 \times 10^7$  Zellen [ $3,78 \times 10^6$  Zellen pro mL] wurde der Versuch abgebrochen.

### 2.2 Messung des Sauerstoffverbrauchs mittels Clark-Elektrode

Das Messprinzip der amperometrischen Sauerstoffmessung beruht auf der Reduktion von molekularem Sauerstoff an einer Goldelektrode (Kathode) zu Wasser. Als Gegenelektrode (Anode) dient eine Silberelektrode als Elektronenquelle. Die entsprechenden Reaktionsgleichungen lauten:



Die entstehenden Silberionen werden mit KCl-Lösung, in welcher sich die Elektroden befinden, gefällt. Eine mit KCl gefüllte Messkammer beinhaltet die Elektrode. Sie ist von der die Zellsuspension enthaltenden Versuchskammer durch eine für molekularen Sauerstoff permeable Polypropylenmembran getrennt. Der messbare Stromfluss zwischen den Elektroden ist dem Sauerstoffgehalt im Messmedium proportional.

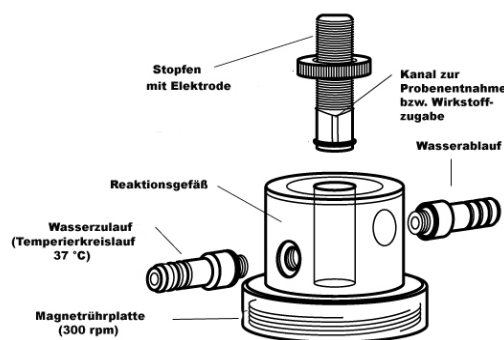
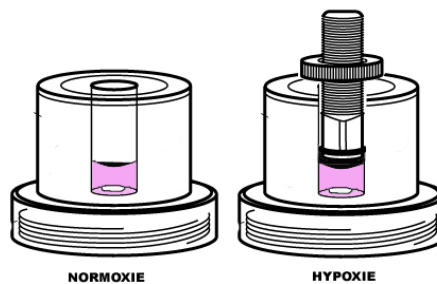


Abbildung 1a Aufbau der Versuchskammer



**Abbildung 1b** Experimenteller Aufbau

Zu Beginn des Experiments wurde zunächst die durch einen Wasserkreislauf auf 37°C erwärmten Versuchskammer mit 1,4 mL des im jeweiligen Versuch verwendeten Mediums - RPMI 1640 mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol **mit** 11,1 mM Glucose bzw. **ohne** Glucose – gefüllt. Nach 3 Minuten der Erwärmung und Equilibrierung mit dem Umgebungssauerstoff wurde die Elektrode in das Medium unter Luftabschluss eingetaucht und der Schreiber vom Typ Pharmacia LKB Rec01 (Pharmacia) (Schreibgeschwindigkeit 0,1 mm/sec) geeicht, wobei die Sauerstoffkonzentration im jeweiligen Medium als 100% der Ausgangskonzentration für die Folgemessungen festgesetzt wurde. Diese wurden später anhand des Integrals unter der aufgezeichneten Sauerstoffsättigungs- / Zeitkurve mit 191 nmol O<sub>2</sub> / mL im Medium mit Glucose und 196 nmol O<sub>2</sub> / mL im Medium ohne Glucose bestimmt. Die in der vorangegangenen Präparation gewonnene Zellsuspension wurde nun in drei Aliquots zu je 1,4 mL aufgeteilt, wobei ein Aliquot in die Versuchskammer der Sauerstoffelektrodeneinrichtung vom Typ 781 (Strathkelvin Instruments, Bearsden Glasgow), sowie ein zweites Aliquot in eine eben solche Versuchskammer gegeben wurde (**Abbildung 1b**). Das dritte Aliquot wurde in ein 15 mL Falconröhrchen pipettiert. Nach einer Equilibrierungszeit von 3 Minuten wurden zu allen drei Aliquots nun jeweils 1,4  $\mu$ L Phorbol-12-myristat-13-acetat, ein Aktivator der Proteinkinase C<sub>n/c</sub> (1:100 vorverdünnt mit jeweiligem Medium) gegeben. Im Anschluss wurden 1,4  $\mu$ L Ionomycin, eines Kalziumionophors, in die Suspension gegeben. Diese Substanzen bewirkten eine sehr starke Stimulation der CD4<sup>+</sup>-Zellen. Beide Proben in den Versuchskammern wurden von Beginn an mit einem Magnetrührer (Typ Ikamag Reo) bei 300 rpm gleichmäßig und kontinuierlich bis zum Ende des Experiments gerührt. Im Falle des ersten Aliquots verhinderte dies ein Konzentrationsgefälle für molekularen Sauerstoff zwischen der Versuchskammer und der mit KCl-Lösung gefüllten und mit einer für Sauerstoff permeablen Polypropylenmembran von der Versuchskammer abgetrennten Messkammer. Beim zweiten Aliquot gewährleistete dies die kontinuierliche Sauerstoffversorgung und sorgte für eine dem

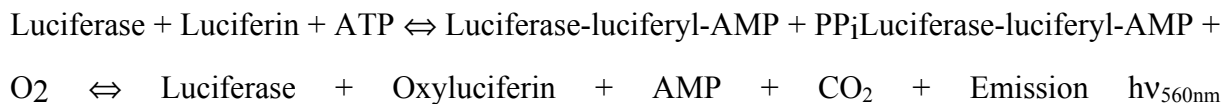


ersten Aliquot vergleichbare mechanische Belastung. Das dritte Aliquot im 15 mL Röhrchen diente als Kontrolle der Ausgangswerte (0h Normoxie) für die ATP-Messungen, die Proteingewinnung zur Westernblotanalyse sowie zur RNA-Isolation für folgende PCR-Analysen. Der Versuch wurde ab dem Aufsetzen der Messelektrode für 360 Minuten durchgeführt, wobei jeweils nach 180 Minuten und 360 Minuten mittels einer 50 µL Hamiltonpipette eine Probe von 50 µL aus Aliquot 1 (Hypoxie) und Aliquot 2 (Normoxie) zur Bestimmung des ATP-Gehaltes entnommen wurde. Nach 360 Minuten wurden erneut je 100 µL Proben zur Propidiumjodidmessung am FACS in je 400 µL PBS/BSA aufgenommen, sowie je 500 µL zur Proteingewinnung und je 500 µL zur RNA-Gewinnung verarbeitet. Die Auswertung des Schreiberpapiers erfolgte per Hand, wobei der Startpunkt der Messung einheitlich bei 90% der initialen Sauerstoffsättigung im Medium festgesetzt wurde.

### 2.3 Bestimmung der ATP-Menge

Das Messprinzip zur Bestimmung der ATP-Menge in einer Probe beruht auf folgender chemischer

Reaktionskette:



Die Intensität des emittierten Lichts ist proportional zur ATP Konzentration in der Probe und ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Probenkonzentration. Das hier verwendete Luciferase-Luciferinsystem der Firma Roche wurde zusammen mit einem für weiße 96-well Mikrotiterplatten geeigneten Luminometer (Monolight 3096, BD Pharmingen) eingesetzt. Laut Herstellerangaben der Firma Roche wurde vor Gewinnung der ATP-Proben aus der Versuchskammer der Sauerstoffelektrode folgender Puffer angesetzt.

ATP Zelllysispuffer:

0,1 mol Tris-HCl

0,004 mol EDTA-acetat

900 ml Aqua dest.

pH Einstellung mit 4N NaOH bis pH 7,75

Auffüllen auf 1000 mL mit Aqua dest.

450  $\mu$ L dieses auf 100°C erhitzten Puffers wurden mit 50  $\mu$ L Probe aus der Versuchskammer mit der Zellsuspension vermischt und zwei Minuten im Wasserbad gekocht. Danach wurde die verdünnte und gekochte Zellsuspension bei 3200 rpm (1000 x g) in der Fresco Zentrifuge bei 4°C pelletiert und 300  $\mu$ L Überstand zur ATP Messung bei -20°C eingefroren. Diese Prozedur wurde für die 0h Kontrolle im 15 ml Röhrchen sowie für die Proben der Versuchskammern nach 180 Minuten und 360 Minuten durchgeführt. Die derart gewonnenen Proben wurden gesammelt und bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt. Nach Abschluss von mehreren Versuchen wurden die Proben aufgetaut und mit zusätzlichen Proben einer Standardverdünnungsreihe von ATP in 50  $\mu$ L Portionen auf eine weiße 96-well Mikrotiterplatte der Firma NUNC pipettiert. Im Luminometer wurde dann in jede Vertiefung 50  $\mu$ L Luciferin / Luciferasemischung durch automatische Zugabe gegeben und für 10 Sekunden gemessen. Aus den relativen Lichteinheiten (RLUs) der zwei bis drei unabhängigen Standardverdünnungsreihen ( $10^{-5}$ - $10^{-10}$  M ATP = 5 Verdünnungsschritte) liessen sich per Mittelwert eine Eichkurve durch doppelt logarithmischer Auftragung und deren Näherungsgleichung ermittelt. Anhand der gemessenen RLUs der Proben war es nun möglich, die ATP-Konzentrationen rechnerisch zu bestimmen. Alle Proben wurden als Doppel- oder Dreifachwerte gemessen.

### **2.4 HIF-1 $\alpha$ Nachweis mittels Westernblot**

Für die Proteinauftrennung mittels Elektrophorese erfolgte zunächst die Aufteilung einer Trenngelmischung bestehend aus 4 mL Aqua dest.; 3,3 mL 30% Acrylamidmix (Roth); 2,5 mL 1,5 M Trispuffer (pH 8,8) und 0,1 mL 10% SDS (Roth); 0,1 mL frischem APS (10%; Roth) und 5  $\mu$ L TEMED (Roth) auf zwei Elektrophoresekammern, die bis zum Abschluss der Polymerisierung mit Aqua dest überschichtet wurde. Nach Dekantieren des Wassers wurde dann eine Sammelgelmischung aus 1,45 mL Aqua dest.; 0,5 mL 30 % Acrylamidmix; 2,5 mL 0,25M Tris (pH 6,8); 0,05 mL SDS 10%; 0,025 mL APS 10% und 6  $\mu$ L TEMED auf die zwei Trenngele geschichtet, ein Kamm eingesteckt und bis zum Abschluss der Polymerisierung der Sammelgele nach Bedarf Sammelgelmischung nachpipettiert, um die Taschenform optimal zu halten. Nach Abschluss der Polymerisation wurden dann die beiden Kämmen entfernt und die Taschen mittels Kanüle mit einem Tris-Glycinpuffer (25mM Tris; 250mM Glycin (pH 8,3); 0,1% SDS) ausgespült. Dadurch wurden die Beladungsbedingungen für jede Tasche vereinheitlicht, weil eventuell nicht polymerisierte Reste entfernt werden konnten. Die im Experiment gewonnenen und mit fünffachem Laemmli-Puffer (Bromphenolblau 100 mg; 3,5

mL Glycerin; 2,5 mL  $\beta$ -Mercaptoethanol; 1,5 g SDS, 1 M Tris-HCl pH 6,8) versetzten Proteinproben wurden nun im Heizblock für ca. 5 Minuten bei 96°C erwärmt. In jede Tasche wurde eine definierte Menge Probe geladen, deren Proteingehalt dem von  $0,5 \times 10^6$  Zellen des jeweiligen Experimentes entsprach (zwischen 15 und 25  $\mu$ L). Der Marker (Precision Plus Protein Standards von Bio-Rad) mit 10 Banden zwischen 250 und 10 kDa wurde im Volumen von 10  $\mu$ L pro Gel asymmetrisch aufgetragen, um Verwechslungen der beiden Gele zu vermeiden. Nun wurde für die ersten 30 Minuten eine Stromstärke von 15 mA pro Gel angelegt, welche nach dem Durchlauf der Bandenfront durch das Sammelgel auf 30 mA pro Gel für weitere 90 Minuten erhöht wurde. Nach dieser elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Gele in einer mit Blottingpuffer gefüllten Wanne auf je eine mit Methanol equilibrierten Blottingmembran aus PVDF mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m (Immobilon-P, Millipore) bestückten Blottingvorrichtung übertragen. Diese wurden in einer Kammer mit Blottingpuffer befestigt, welche durch einen Rührmagneten und Magnetrührer sowie einen Eisakku kontinuierlich über Nacht bei einer angelegten Spannung von 30V im Kühlraum gekühlt werden musste. Am nächsten Morgen wurden dann nach Eiswechsel die Spannung auf 100 V für eine weitere Stunde erhöht. Um die Übertragung von den Gelen auf die Membran zu überprüfen, wurden die Membranen nun 5 Minuten mit Ponceau-S inkubiert und mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Blotmembranen mit der proteintragenden Seite nach innen gerollt und in ein 50 mL Falconröhrchen überführt. Nun erfolgte der Block unspezifischer Bindungsstellen für die folgenden Antikörper mittels je 25 mL 5% Magermilchpulverlösung (2,5 g Magermilchpulver in 50 mL TBS-Tween20 (Tris-buffered saline; Tweenanteil 0,05%) für 2 Stunden auf einem Falconrotator (Milenyi) bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Danach wurde dreimal für je 10 Minuten mit TBS-Tween gewaschen und anschließend der spezifische murine IgG<sub>1</sub> Antikörper (BD) gegen ein Epitop von humanem HIF-1 $\alpha$  in einer Verdünnung in TBS-Tween zwischen 1:500 bis 1:300 in einem Volumen von 10 mL in die Falconröhrchen gegeben und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Falconrotator inkubiert. Nach nochmaligem dreifachen Waschen mit TBS-Tween wurde nun der zweite, an eine Peroxidase gekoppelte, anti murin IgG<sub>Heavy and light</sub> (HRP-gekoppelt PROMEGA) Antikörper in einem Volumen von 10 mL und einer Verdünnung von 1:10000 in die Falconröhrchen gegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Blots nun aus den Falconröhrchen heraus auf eine Folie gelegt und mit ECL-Lösung (Amersham) für 5 Minuten inkubiert, bevor sie dann in einer Filmkassette (Hypercassette; Amersham) in einer Dunkelkammer für 5 Minuten und 13 Minuten dem Film ausgesetzt wurden. Der Film wurde in einer Kodak Maschine (X-OMAT

1000 Processor) entwickelt. Um den gleichmäßigen Auftrag der Proteinproben zu überprüfen, wurde nun ein Abgleich mit dem unregulierten Strukturprotein  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Hierzu wurden die Blots mit einer  $\beta$ -Mercaptoethanollösung (100 mM) für 25 Minuten bei 50 °C inkubiert, um die auf den Blots befindlichen Antikörper der ersten Prozedur zu denaturieren und ihre Bindung zu zerstören. Nach mehrmaligem Waschen und erneutem Blocken mit 5% Magermilchpulver für 2 Stunden waren die Blots dann wieder für eine weitere Immunoblottingprozedur mit einem murinen Anti- $\beta$ -Aktin-IgG<sub>1</sub>-Antikörper (Sigma) in einer Verdünnung in TBS-T von 1:10000 und dem Peroxidase gekoppelten anti murin IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 zu verwenden. Die ECL-Lösung wurde dabei erst in der Dunkelkammer unmittelbar vor der Filmbelichtung zugesetzt, da das Leuchtsignal schon mit bloßem Auge zu erkennen war und der Substratumsatz durch die Peroxidase sehr schnell erfolgte. Die Filmbelichtungszeit wurde bedingt durch das starke Signal auf zehn Sekunden herabgesetzt. Die Filme beider Detektionen wurden digitalisiert und übereinander gelegt, so dass man die Auftragsqualität parallel zur HIF1- $\alpha$  Expression der einzelnen Proben beurteilen konnte.

### **2.5 Bestimmung der Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 und MCAF aus den Überständen**

Die Messung von Proteinen aus den Zellsuspensionsüberständen beruht auf einem Multiplex ELISA Prinzip, das von Biorad entwickelt wurde. Dabei werden mit spezifischen Antikörpern beschichtete synthetische Kügelchen (Beads), die in ihrem Innern eine Mischung aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen mit spezifischer Absorptions- und Emissionswellenlänge besitzen, mit den Überständen inkubiert. Ein zweiter Detektionsantikörper bindet das jeweilige Zytokin an einem anderen Epitop. Nun wird dieser Antikörper über Streptavidin an PE gekoppelt. Aus der Anzahl spezifisch leuchtender Beads und der simultanen Messung der durch PE hervorgerufenen Emission pro Bead, lässt sich mittels Standardverdünnungsreihe einer definierten Zytokinmischung die Zytokinkonzentration aus den Überständen bestimmen. Hierzu wurde eine Standardverdünnungsreihe im Medium durch sukzessive 1:4 Verdünnung einer 500 ng/mL Stocklösung in 7 Verdünnungsstufen hergestellt. Eine MultiScreen™ 96 well Mikrotiterplatte (Millipore) wurde nun mit 100  $\mu$ L pro Vertiefung PBS / BSA / ACID equilibriert. Anschließend wurde eine Mischung der mit dem Primärantikörper konjugierten Beads mit PBS / BSA / ACID in solcher Weise hergestellt, dass man pro Vertiefung 0,4  $\mu$ L Beads der jeweiligen Zytokinspezifität ( $\Rightarrow$  2,8  $\mu$ L Beads mit allen 7 zu

bestimmenden Zytokinen) in 50 µL Endvolumen PBA erhielt. Nach zwei Waschschritten mit PBS / 0,05% Tween-20 wurden pro well 50 µL Standard oder Probe gegeben und die Platte dunkel bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (IKA® KS 130 basic) für 30 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das BIOPLEX Gerät nach Herstellerangaben kalibriert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS / 0,05% Tween-20 wurde die Mischung der sieben spezifischen Detektionsantikörper mit PBA in jede Vertiefung gegeben, wobei die Antikörper 1 : 400 in einem Volumen von 25 µL pro Vertiefung verwendet wurden. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln mit 300 rpm und erneutem dreimaligem Waschen wurde eine Mischung aus Streptavidin PE und PBA im Verhältnis 1:100 so eingesetzt, dass pro Vertiefung 50 µL verbraucht wurden. Dann wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 300 rpm Schütteln im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS / 0,05% Tween-20 wurden in jede Vertiefung 125 µL PBA gegeben und die Platte im BIOPLEX Gerät ausgelesen.

Die Wahl der gemessenen Zytokine beruhte auf einem Screening von Überständen zweier Experimente auf zehn verschiedene Zytokine. Als Kandidaten für weitere Messungen wurden die Zytokine gewählt, die in diesen Pilotexperimenten am stärksten durch Hypoxie beeinflusst waren.

## **2.6 Aufarbeitung der RNA und Umschreiben in cDNA**

### **2.6.1 Präparation der total RNA**

Zur Aufbereitung der RNA Proben, die mittels  $\beta$ -Mercaptoethanol versetztem RLT-Puffer während der Versuche gewonnen wurden, wurde das RNAeasy Minikit mit Homogenisierungssäulen (QIAshredder™, Qiagen) und DNase (Qiagen) nach Herstellerprotokoll verwendet. Hierzu wurden die mit RLT-Puffer versetzten Proben aufgetaut und durch eine Homogenisierungssäule zentrifugiert, wobei die genomische DNA entfernt und die Viskosität der Lysate verringert wurde. Danach wurde Ethanol im Verhältnis 1:2 zum Eluat gegeben, um die Bindungsfähigkeit der RNA an die folgende Säule zu optimieren. Nun wurde das RNA-Ethanol Gemisch durch eine zweite Säule (RNeasy spin column) zentrifugiert, um die RNA an der Säulenmembran zu binden. Durch Waschschriffe mit RW1-Puffer aus dem Kit wurde die Säule von etwaigen Kontaminationen befreit. Anschließend wurde, um mögliche DNA-Reste vollständig zu entfernen ein 20minütiger Verdau von DNA bei Raumtemperatur auf der Membran mittels einer DNase (DNase I von Qiagen) durchgeführt. Nach Waschen mit RW1-Puffer wurde dann zweimal mit ethanolversetztem RPE-Puffer aus dem Kit gewaschen. Schließlich wurde die RNA mittels 30

$\mu\text{L}$  RNase freien Wassers in ein neues Eppendorffgefäß ausgewaschen. Der Gehalt an RNA in den Eluaten wurde mittels Bioanalyser auf der Grundlage der 18S- und 28S-RNA-Banden und eines Standards bestimmt. Hierzu werden in einem elektrophoretischen Prozess die Stärke der 28S- und 18S-Banden, welche typisch für humane RNA sind, gegen einen Standard mit bekannter RNA-Konzentration abgeglichen. Hierbei ergaben sich Gesamt-RNA Mengen zwischen 300 ng und 3  $\mu\text{g}$  in jeweils 30  $\mu\text{L}$  Endvolumen.

### Umschreiben in cDNA

Um die im vorigen Abschnitt gewonnenen RNA Proben für die PCR Analyse nutzbar zu machen, musste diese in stabilere und für die DNA-Polymerase verwendbare cDNA umgeschrieben werden. Jeweils 300 – 400 ng RNA wurden zum Umschreiben in cDNA mit dem TaqMan<sup>®</sup> Kit von Applied Biosystems verwendet. Hexamere mit zufälliger Basenabfolge (Random Hexamere) als Nucleotidhexamere und Oligo-dTs wurden als unspezifische Primeräquivalente der cDNA Synthese im Mischungsverhältnis 1:2 eingesetzt, um möglichst die gesamte RNA in cDNA umzuschreiben. Setzt man Oligo-dTs, also eine Abfolge von Desoxythymidinbausteinen allein ein, so erhält man nur die cDNA, welche aus mRNA mit ausreichend langen Polyadenylierungssequenzen umgeschrieben wird. Random Hexamere ermöglichen auch das Umschreiben von RNA mit fehlender (t-RNA, r-RNA) oder zu kurzer Poly-A Sequenz (in Degradation befindliche mRNA).

Es wurde folgender Ansatz zum Umschreiben in cDNA verwendet:

20  $\mu\text{L}$  Ansatz :

x  $\mu\text{L}$  RNA (400 ng)

2,0  $\mu\text{L}$  TaqMan<sup>®</sup> 10 x Puffer

4,4  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$

4,0  $\mu\text{L}$  dNTPs

0,5  $\mu\text{L}$  Random Hexamere

0,5  $\mu\text{L}$  Oligo-dTs

0,4  $\mu\text{L}$  RNase Inhibitor

0,5  $\mu\text{L}$  Reverse Transkriptase

y  $\mu\text{L}$  RNase freies Wasser

---

$\Sigma$  20  $\mu\text{L}$  (x + y = 7,7  $\mu\text{L}$ )

Als Programm für den Thermocycler wurde unten stehende Schrittabelle verwendet. Dieses Programm ermöglicht zunächst das Anlagern der Oligo-dTs und der Random Hexamere (Schritt 1) an die RNA, gibt anschließend der Reversen Transkriptase die Möglichkeit, alle markierten Fragmente in cDNA umzuschreiben (Schritt 2), und zerstört schließlich die Reverse Transkriptase durch Denaturierung bei 95°C (Schritt 3).

1. 25°C für 10 Minuten
  2. 48°C für 40 Minuten
  3. 95°C für 5 Minuten
  4. 4°C Pause
- Deckeltemperatur: 100°C

Nach dem Umschreiben wurden die 20 µL Proben bei –20°C eingefroren. Vor der ersten PCR wurden von jeder Probe Verdünnungen im Verhältnis 1:10 hergestellt, von denen je 5 µL pro Probe und PCR verwendet wurden.

## 2.6.2 Light Cycler Realtime PCR im Sybr Green Format

Das Design der Primer für Hexokinase-1 erfolgte mit dem Programm Oligo-4 (Molecular Biology Insights, Inc. USA) basierend auf einer durch Multiple Alignment erstellten Konsensussequenz der fünf bekannten Transkriptvarianten mit den in **Tabelle 2a** dargestellten Zugriffsnummern. Die Primerpaare für das Superoxiddismutase-1 Gen und das β-Aktin-Gen wurden ebenfalls mit Oligo-4 erstellt.

**Tabelle 2a** Primerkombinationen und Zugriffsnummern der verwendeten Zielgene

Genname	Variante	Zugriffsnummer	Primersequenz
Hexokinase-1	1	NM_000188	Forward:
	2	NM_033496	5' GTG CTG CTG GTG AAA ATC
	3	NM_033497	CGT AGT 3'
	4	NM_033498	Reverse:
	5	NM_033500	5' CCT TTG ATC CCC ATG TAG TCC AAG A 3'
Superoxiddismutase Typ 1 (Cu/Zn)		NM_000454	Forward:
			5' TCA TCA ATT TCG AGC AGA AG 3' Reverse: 5' AGA CTA CAT CCA AGG GAA TG 3'

$\beta$ -Aktin		NM_001101	Forward: 5' GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATC ACT 3' Reverse: 5' TGA TCC ACA TCT GCT GGA AGG T 3'

Die Light Cycler Realtime PCR zeichnet sich dadurch aus, dass man online nach jedem PCR Zyklus die relative Menge an DNA im Probenansatz bestimmen kann. Dies erfolgt über die Messung der Fluoreszenz eines sich in die doppelsträngige DNA einlagernden Farbstoffes (Sybr Green). Sybr Green besitzt die Eigenschaft, an doppelsträngige DNA gebunden ca. einhundertfach stärker auf eine Anregung durch einen Laserstrahl mit der Emission von Licht zu reagieren, als an einzelsträngige DNA gebundener Farbstoff. Erhöht sich nun die Kopienzahl durch die Vervielfältigung innerhalb eines PCR Zyklus, so steigt parallel die Leuchtintensität des Farbstoffes. Voraussetzungen für eine Sybr-Green basierte Realtime PCR sind spezifische, also nur ein Produkt liefernde Primerpaare, eine geeignete Fragmentlänge des Amplikons (zwischen 100 und 500 bp) und eine geeignete Kopiereffizienz des Systems. Optimal ist die Effizienz von 2, also eine Verdopplung der Kopienzahl pro Zyklus. In der Realität ist jedoch meistens mit einer Effizienz zwischen 1,8 und 2 zu rechnen. Effizienzen unter 1,8 eignen sich sehr schlecht für die spätere Quantifizierung der Produkte, da man hier pro Zyklus von einer Fehlerrate von 20% ausgehen kann. Dieser Fehler summiert sich besonders, wenn einzelne Proben mehrere Zyklen Differenz aufweisen. Wie auch bei der konventionellen PCR muss vorher das Mischungsverhältnis der Einzelkomponenten eines Ansatzes optimiert werden. Hierbei spielen die Magnesiumchloridkonzentration sowie die Anlagerungstemperatur für das Primerpaar eine entscheidende Rolle. In Vorexperimenten wurden mit Verdünnungsreihen von Magnesiumchlorid und durch Veränderungen in der Reaktionstemperatur die optimalen Messbedingungen gefunden. Diese sind für jedes Primerpaar unterschiedlich und in der dem Ansatz folgenden **Tabelle 1b** dargestellt. Die Zeiten für die PCR Programme richten sich nach der Fragmentlänge und dem eingesetzten Primerpaar. Man kann abschätzen, dass das hier verwendete Enzym eine Syntheserate von 25 bp pro Sekunde aufweist. Demzufolge wurden die Kopierzeiten (Transkription) an die jeweiligen Fragmentlängen angepasst.

Für die Light Cycler PCR wurde folgender Ansatz pro 20  $\mu$ L verwendet:



5,56 µL Aqua<sub>bidest</sub>  
 1,0 µL (10 µM) forward Primer (TIBMOL)  
 1,0 µL (10 µM) reverse Primer (TIBMOL)  
 5,0 µL (X mM) MgCl<sub>2</sub>  
 2,44 µL Sybr-Green Mix von Mark Rosowsky (DRFZ)  
 5,0 µL Probe (cDNA 1:10 bzw. Aqua<sub>bidest</sub>)

Tabelle 2b: **Light Cycler Bedingungen verschiedener genspezifischer Primerpaare**

<b>Gen</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> Konzentration</b>	<b>Programm</b> Denaturierung – Annealing – Transkription	<b>optimale Annealing Temperatur</b>	<b>Produktlänge</b>
Hexokinase-1 TV 1-5	8 mM	10 s - 5 s - 8 s	68 °C	161 bp
SOD 1	7 mM	15 s – 15 s – 22 s	59 °C	434 bp
β-Aktin	7 mM	5 s - 5 s - 9 s	64 °C	141 bp

Zur Ermittlung der Effizienzen für die einzelnen Light Cycler PCR Läufe wurde bei jedem Lauf eine Standardverdünnungsreihe verwendet. Für die Etablierung wurde cDNA von HeLa-Zellen verwendet, die in DFX-haltigem Medium inkubiert waren. DFX als Eisenchelator simulierte hierbei einen hypoxischen Zustand. Als Kalibrator wurde eine unabhängig erstellte 1:100 Verdünnung von dieser cDNA eingesetzt, über die dann die einzelnen Läufe gegeneinander abgeglichen werden konnten.

## 2.7 Klonierung und Sequenzierung der PCR Produkte

Die aus den PCR gewonnenen Produkte für β-Aktin, Hexokinase und SOD1 wurden mit dem TOPO-TA 2.1 Cloning Kit von Invitrogen in chemokompetente E. coli kloniert. Hierzu wurde das Herstellerprotokoll verwendet.

In der Zwischenzeit wurden Petrischalen mit Ampicillin (100 µg/mL) versetztem Agar-Agar (1,5%)-LB Medium unter sterilen Bedingungen gegossen. Nach der Inkubation im Brutschrank wurden 200 µL der transformierten Bakterien auf mit Ampicillin versetzte Medienträgern ausplattiert und über Nacht inkubiert. Danach wurde eine repräsentative Zahl von Bakterienkolonien pro Platte einer PCR unterzogen. Dadurch konnten positive Klone identifiziert werden, welche das Plasmid mit dem PCR Produkt in ihrem Zytoplasma inkorporiert hatten. Jeweils zwei positive Klone wurden über Nacht in mit Ampicillin versetztem LB Flüssigmedium bei 37°C vermehrt. Am folgenden Tag erfolgte eine Plasmid-

DNA-Isolation aus den im Flüssigmedium gewachsenen Kolonien nach dem Protokoll des Plasmid DNA Purification Kit (Macherey / Nagel) mittels NucleoSpin Säulen. Die gewonnene Plasmid DNA wurde einem Restriktionsverdau durch das Restriktionsenzym ECO-I unterzogen. Das Verdauprodukt wurde neben unverdaulichem Plasmid auf ein Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht fotografiert. Die gesamte Prozedur der Transfektion der PCR Fragmente in E. coli Bakterien über dieses Vektorsystem diente der Vermehrung der Fragmente für die anschließende Sequenzierung. Der Restriktionsverdau wurde zur Kontrolle des Klonierungserfolges verwendet.

### Sequenzierung

Um die Sequenz des durch die PCR amplifizierten Fragmentes zu verifizieren, wurde die isolierte Plasmid-DNA einer Markierungs- und Vermehrungsreaktion nach der Methode von Sanger et al. unterzogen (53). Das Prinzip dieser Reaktion ist, auf der Grundlage einer PCR ähnlichen Amplifikationsreaktion mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Abbruchnukleotiden (ddNTPs) dem Zufall nach unterschiedlich lange Amplifikate zu erzeugen, deren endständiges Nukleotid mit einem basenspezifischen Farbstoff markiert ist. Trennt man das entstandene Gemisch an Fragmenten elektrophoretisch auf und regt die fluoreszenzmarkierten Nukleotide mit einem Laserstrahl an, so kann man anhand der Farbabfolge im Gel die Basenabfolge der Sequenz herleiten.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde in folgender Weise für den Sequenzierungsansatz verwendet:

1,5 aqua dest.  
6,0 µL isolierte Plasmid-DNA  
0,5 µL M13 Primer forward bzw. reverse (10 µM)  
2,0 µL BigDye Mix

---

### Σ 10 µL Reaktionsgemisch

Als Amplifikationsprogramm wurden folgende Einstellungen am PCR-Cycler vorgenommen:  
Programm:

## Materialien und Methoden

- 1 96°C Pause
- 2 96°C 10 Sekunden (Denaturierung)
- 3 45°C 5 Sekunden (Anlagerung des Primers)
- 4 60°C 4 Minuten (Vervielfältigung) Wiederholung ab Schritt 2 (29x)
- 5 4°C Pause

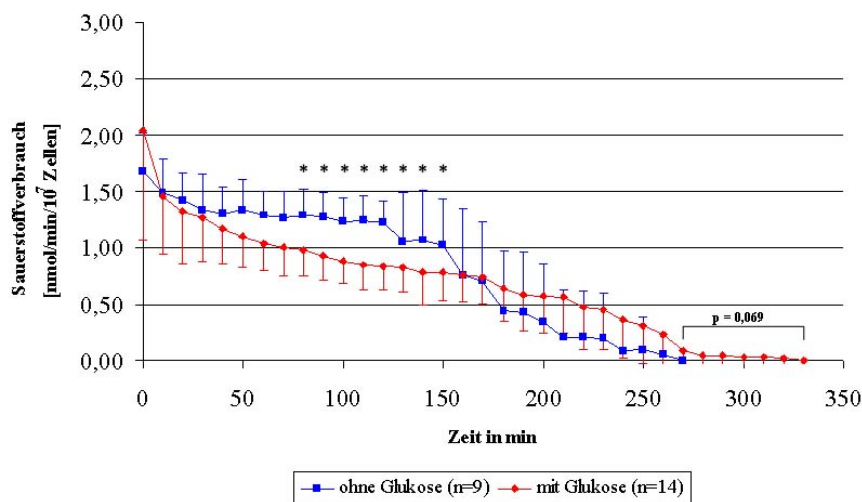
Nach der Vervielfältigung wurden die Produkte mit Ethanol gefällt. Hierzu wurden zum 10 µL Ansatz aus der Amplifizierung 80 µL Aqua dest., 10 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 µL Ethanol (96%v/v) gegeben und das Gemisch 30 Minuten bei 13.000 rpm (16.000 x g) pelletiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde mit 250 µL 70% Ethanol resuspendiert und nochmals für 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit 20 µL Aqua dest. resuspendiert und in die Sequenzierungsmaschine (Applied Biosystems, ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser) gegeben. Hier regte ein Laserstrahl die Abbruchnukleotide der in einer mit Agarosegel gefüllten Kapillare elektrophoretisch aufgetrennten Produkte aus dem Amplifikationsgemisch zur Emission von Licht definierter Wellenlänge an. Die Abfolge der Emissionspeaks ergab nun die Basenabfolge des ursprünglich klonierten PCR Produktes. Die Sequenzierungsergebnisse wurden nun mittels CHROMAS145-95 und BLAST ausgewertet.

### 3 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der einzelnen Messungen zum Sauerstoffverbrauch, zur ATP-Messung, zum Zellüberleben, zur HIF-1 $\alpha$ -Expression und zur Expression ausgewählter Zytokine sowie zur Regulation der Zielgene Hexokinase-1 und SOD1 dargestellt.

#### 3.1 Kinetik des Sauerstoffverbrauchs von PMA- / Ionomycin-stimulierten CD4<sup>+</sup> Zellen

Abbildung 2 zeigt, dass der Sauerstoffverbrauch von CD4<sup>+</sup>-Zellen von den verwendeten Kulturbedingungen abhängig ist. Lymphozyten weisen im Medium mit Glukose unter Hypoxie einen kontinuierlichen Abfall ihres Sauerstoffverbrauchs bis zum Erreichen der Anoxie auf. Dagegen zeigen Lymphozyten im Medium ohne Glukose einen konstanten Verbrauch über die ersten 120 Minuten, danach tritt eine deutliche Verminderung der Atmungsrate ein. Ab 160 Minuten ist der mittlere Verbrauch der Zellen im Medium ohne Glukose geringer als im Medium mit Glukose.

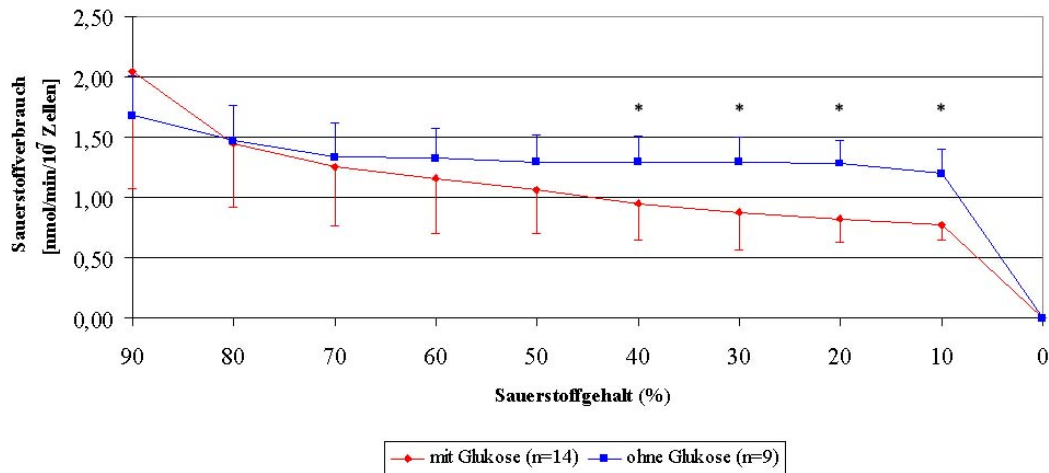


**Abbildung 2:** Sauerstoffverbrauch stimulierter CD4<sup>+</sup>-Zellen in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium Mittels Clark Elektrode gemessener Sauerstoffverbrauch von PMA- / Ionomycin- stimulierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten während sechsständiger Inkubation in nmol / (10<sup>7</sup> Zellen x min); \* – signifikanter Unterschied im Sauerstoffverbrauch der Zellen im Medium ohne Glukose bzw. mit Glukose (p<0,05).

Die im Mittel eingesetzten  $5.6 \times 10^6$  Zellen (entspricht einer Konzentration von durchschnittlich  $4 \times 10^6$  Zellen / mL Medium) erreichten den Anoxiezustand im Medium mit Glukose nach  $236 \pm 46$  Minuten während im Medium ohne Glukose der Sauerstoff schon nach  $185 \pm 42$  Minuten vollständig aufgebraucht war. Dieser Unterschied zeigt sich mit einem

## Ergebnisse

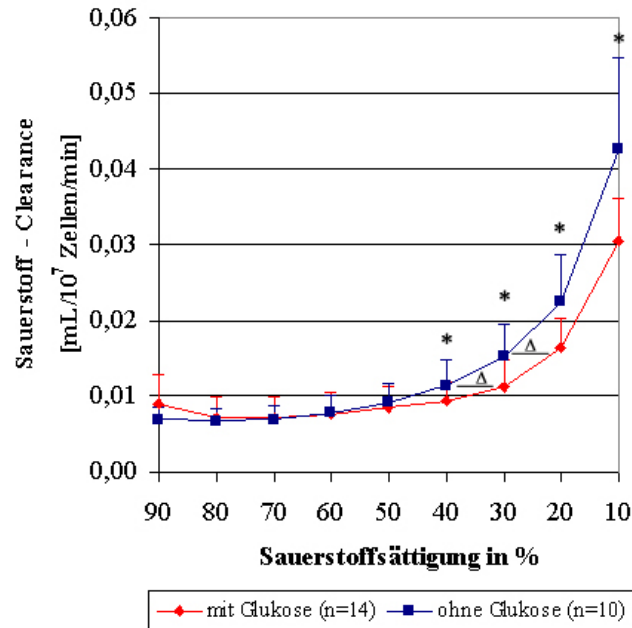
p-Wert von 0,069 nur als Trend. In **Abbildung 3a** ist die Atmungsrate in Bezug zum verbrauchten Sauerstoffanteil im Medium gesetzt. Hier kann man erkennen, dass die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten im Medium ohne Glukose im Bereich zwischen 70% und 10% Sauerstoffsättigung eine konstante Atmungsrate zeigen. Dagegen sinkt sie bei den im Medium mit Glukose kultivierten Zellen kontinuierlich.



**Abbildung 3a:** Atmungsrate stimulierter CD4<sup>+</sup>-Zellen bezogen auf den Sauerstoffgehalt im Medium: Sauerstoffverbrauch von PMA- / Ionomycin- stimulierten CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (in nmol pro min und 10<sup>7</sup> Zellen) in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt im Medium (in % des Ausgangswertes). \* signifikanter Unterschied im Verbrauch zwischen Zellen im Medium ohne bzw. mit Glukose (p<0,05).

Signifikante Unterschiede zeigen sich hier, wenn 60 % des Sauerstoffs verbraucht sind, also ab einer Sauerstoffsättigung im Medium von 40% der Ausgangssättigung. In **Abbildung 3b** ist die Sauerstoffclearance dargestellt. Sie errechnet sich aus dem Quotienten der Atmungsrate [nmol O<sub>2</sub>/(10<sup>7</sup> Zellen x min)] und der Sauerstoffkonzentration im Medium [nmol O<sub>2</sub> / mL] und hat die Einheit mL Medium/(10<sup>7</sup> Zellen x min). Sie gibt die Menge Medium an, die durch 10<sup>7</sup> Zellen in einer Minute komplett von Sauerstoff befreit wird.

## Ergebnisse



**Abbildung 3b** Sauerstoffclearance PMA- / Ionomycin-stimulierter CD4<sup>+</sup>-Zellen:

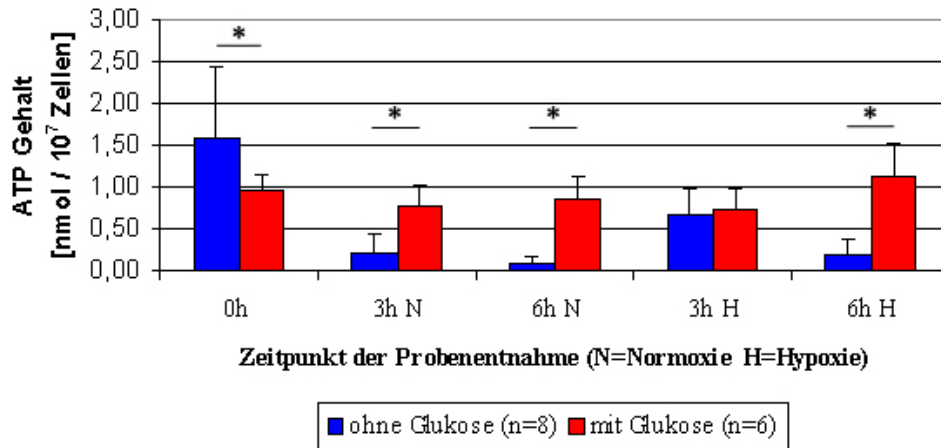
Die Clearance gibt an, wieviel mL Medium von 10<sup>7</sup> Zellen pro Minute komplett von Sauerstoff befreit werden. Sie ist ein Maß für die Intensität, mit der Sauerstoff durch die Zellen aus dem Medium extrahiert wird. \* signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationsmedien (p<0,05). Δ zeigt die Phasenverschiebung.

Die Clearancekurve der Zellen im Medium mit Glukose ist ab einer Sättigung von 50% bis zu einer Sättigung von 20% gegenüber der Kurve ohne Glukose phasenverschoben. Die Phasenverschiebung (Δ) beträgt ungefähr 10% Sättigung oder ca. 25 nmol O<sub>2</sub> / mL.

### 3.2 Ergebnisse der Quantifizierung von ATP

Es wurde festgestellt, dass der ATP-Gehalt bei im Medium mit Glukose inkubierten Zellen eine relative Konstanz aufweist. Zellen unter Glukosemangel zeigen anfänglich einen höheren ATP-Gehalt, der dann jedoch deutlich absinkt und auch durch die Inkubation ohne Sauerstoffbeschränkung nicht mehr auf den Ausgangswert angehoben wird. **Abbildung 4** zeigt die Ergebnisse der Messungen des ATP-Gehalts der Zellen in beiden Medien zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation.

## Ergebnisse



**Abbildung 4:** ATP Mengenmessung in stimulierten CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten

Messung des ATP-Gehalts (in nmol/10<sup>7</sup> **Zellen**) einer repräsentativen Probe von 50 µL Zellsuspension am Anfang, in der Mitte und am Ende der Inkubation mit einem Luciferin / Luciferase System (Roche) im Luminometer ; \* signifikante Unterschiede im ATP Gehalt zwischen beiden Kulturbedingungen (p < 0,05)

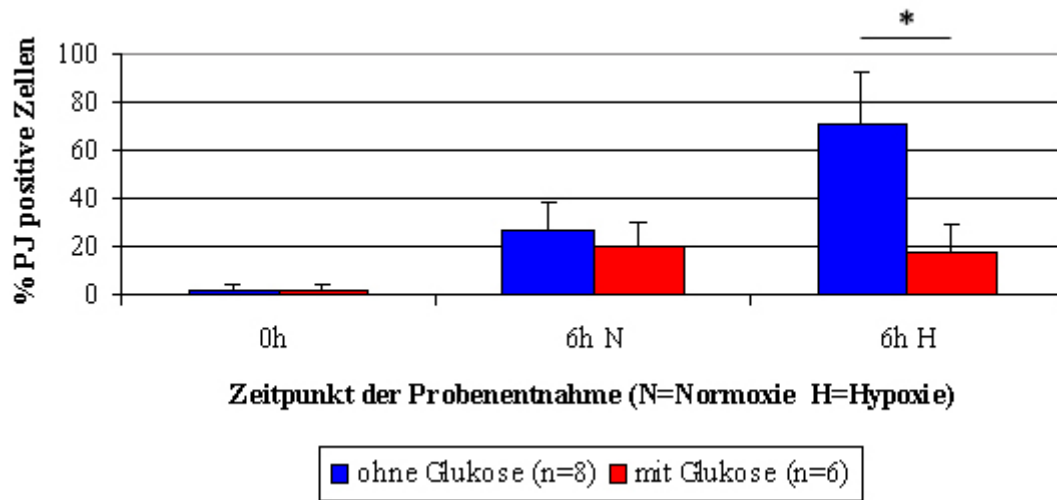
Der zelluläre ATP-Gehalt ist bei Inkubation der Lymphozyten im Medium mit Glukose für die Zeitpunkte 3h Normoxie und 6h Normoxie und Hypoxie signifikant höher als im Medium ohne Glukose. Anfänglich zeigen Zellen, die in glukosefreiem Medium präpariert wurden einen signifikant höheren ATP-Gehalt.

### 3.3 Überlebensrate der Zellen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Einen wichtigen Aspekt zur Beurteilung der Zellfunktion stellt die Überlebensrate der Zellen dar. Nur funktionell intakte Zellen sind für die Entzündungsprozesse von Bedeutung. Dadurch ergab sich die Notwendigkeit, die Überlebensrate der Zellen per FACS-Analyse zu bestimmen. Propidiumjodid lagert sich hierbei in die DNA von permeablen Zellen ein und färbt diejenigen dauerhaft an, welche den Farbstoff nicht mehr aktiv an ihre Umgebung abgeben können. Somit kann eine mit Propidiumjodid gefärbte Zelle als funktionell eingeschränkt betrachtet werden. Dieser Einschränkung liegen meist Prozesse des Zelluntergangs zu Grunde.

**Abbildung 5** zeigt die Überlebensrate der Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

## Ergebnisse



**Abbildung 5:** Viabilitätsmessung durch FACS Analyse mittels Propidiumjodidfärbung. Veränderung der Propidiumjodidanfärbbarkeit unter den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen. Für die FACS Analyse wurden pro Messung mindestens 10.000 Zellen analysiert. \*-signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen ( $p < 0,05$ )

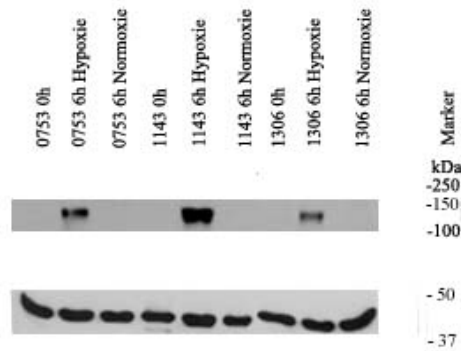
Die Abbildung zeigt, dass nach sechs Stunden unter allen Inkubationsbedingungen etwa 70-80% der Zellen noch vital sind. Eine Ausnahme bildet die Inkubation unter Normoxie und ohne Glukose, wo nur noch 10-30 % der Zellen vital sind.

### 3.4 Westernblot zur Darstellung von HIF-1 $\alpha$

Die Zellproteinlysate wurden zur Bestimmung der HIF-1 $\alpha$  Expression durch die Zellen in einem Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit Antikörpern markiert. An diese Antikörper waren Peroxydasen gebunden, die ein Substrat unter Lumineszenzbildung umsetzten. Mit dem durch die Lumineszenz erzeugten Licht war es möglich, einen Film zu belichten. Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 $\alpha$  als ein Indikatorprotein für hypoxischen Stress in vermehrtem Maße bei den hypoxisch inkubierten Zellen auftrat. Diese Aussage illustrieren die **Abbildungen 6a** und **6b**.

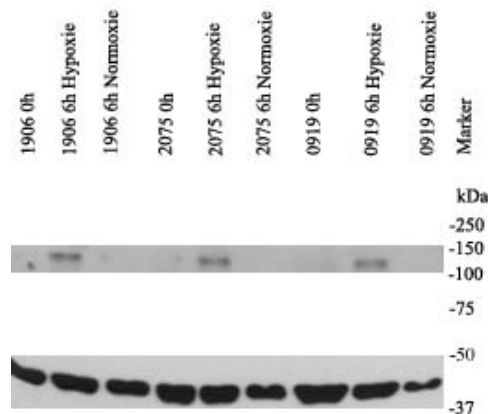


## Ergebnisse



**Abbildung 6a:** Westernblot zum Nachweis von HIF-1 $\alpha$  im Medium mit Glukose CD4+-Lymphozyten wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Der Immunoblot zum Nachweis von HIF-1 $\alpha$  erfolgte unter Verwendung von Proteinlysaten dreier Experimente (0753,1143 und 1306) Zur Normierung wurde das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin verwendet.

HIF-1 $\alpha$  war bei den Zellen am Anfang der Inkubation (0h) nicht nachweisbar. Nach sechs Stunden unter sauerstoffreichen Bedingungen (6hN) zeigte sich kein HIF-1 $\alpha$ . Nach sechs Stunden unter Luftabschluss (6hH) war jedoch eine deutliche HIF-1 $\alpha$  Bande zu erkennen.



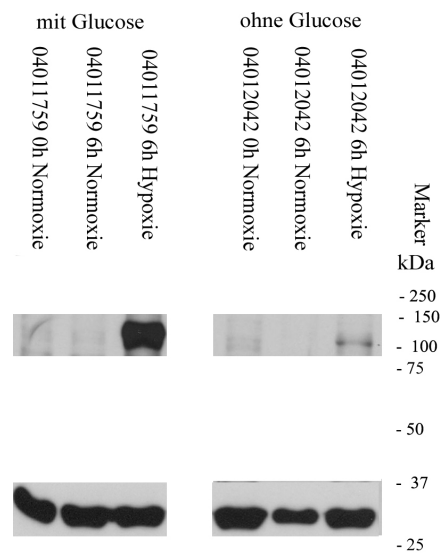
**Abbildung 6b:** Westernblot zum Nachweis von HIF-1 $\alpha$  im Medium ohne Glukose CD4+-Lymphozyten wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert. Der Immunoblot zum Nachweis von HIF-1 $\alpha$  erfolgte unter Verwendung von Proteinlysaten dreier Experimente (1906,2075 und 0919) Zur Normierung wurde das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin verwendet.

In beiden Abbildungen ist deutlich die Expression von HIF-1 $\alpha$  durch die verminderte HIF-1 $\alpha$  Degradation unter Hypoxie, wie in der Einleitung erwähnt, zu erkennen. Somit konnte man auf eine intrazelluläre Präsenz des HIF-1 $\alpha$  Proteins bei den hypoxischen Proben schließen.

In **Abbildung 6c** sind die Proteinproben von einem Versuch mit Glukose und einem Versuch

## Ergebnisse

ohne Glukose nebeneinander dargestellt. Es ist ein deutlicher quantitativer Unterschied in der Expression von HIF-1 $\alpha$  zum Zeitpunkt 6hH erkennenbar.



**Abbildung 6c** Immunoblot von HIF-1 $\alpha$  und  $\beta$ -Aktin von Lysaten von PMA- / Ionomycin- stimulierten CD4<sup>+</sup>- Zellen Medienvergleich

### 3.5 Messung der Zytokinkonzentrationen mittels Multiplex-ELISA

In den **Abbildungen 7 bis 13** sind die Ergebnisse der Zytokinquantifizierung aus den Kulturüberständen dargestellt. Jede Abbildung gibt die Konzentration des jeweiligen Zytokins in Pikogramm bezogen auf die Zellzahl für die verschiedenen Inkubationsbedingungen wieder. Die Fehlerbalken der folgenden Abbildungen sind jeweils der SEM. Signifikante Unterschiede wurden ab  $p < 0,05$  angenommen und mit \*- gekennzeichnet. Als statistische Tests wurden der Wilcoxon-Test für verbundene und der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Anhand der Ergebnisse lassen sich die Zytokine in vier verschiedene Reaktionskategorien einteilen.

1. Zur ersten Gruppe gehören die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8 und IL-10 (**Abbildungen 7 bis 10**). Zytokine dieser Gruppe weisen eine Abhängigkeit ihrer stimulierten Expression vom Glukoseangebot auf, wobei Glukoseverfügbarkeit eine signifikant stärkere Zytokinexpression im Vergleich zu Glukosemangel bewirkt. Bei allen Zytokinen dieser Gruppe zeigt sich auch, dass Hypoxie unabhängig vom Glukoseangebot ihre Expression signifikant verstärkt.

2. IL-6 weist ein Expressionsprofil auf, das sich von dem der Zytokine in der ersten Gruppe unterscheidet (**Abbildung 11**). Es zeigt sich ebenfalls, dass Glukose die Zytokinexpression

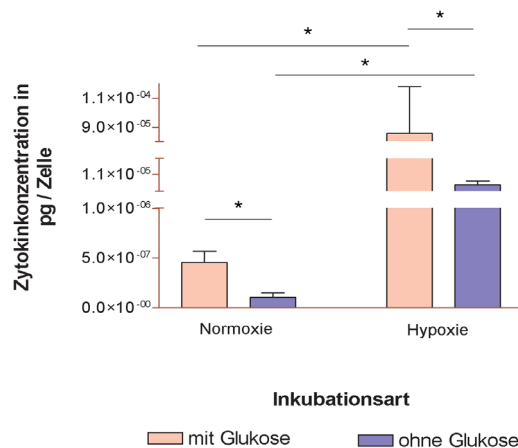
## Ergebnisse

verstärkt. Hypoxie verstärkt jedoch nur im Medium mit Glukose die Expression von IL-6 signifikant.

3. Zur dritten Art von Expressionsprofil gehört das von  $\text{TNF-}\alpha$ , das in **Abbildung 12** dargestellt ist. Hier zeigt sich wieder ein signifikanter Einfluss der Glukoseverfügbarkeit. Im Gegensatz zu allen anderen Zytokinen kann man hier jedoch beobachten, dass Hypoxie die Expression von  $\text{TNF-}\alpha$  im Vergleich zur Normoxie signifikant vermindert.

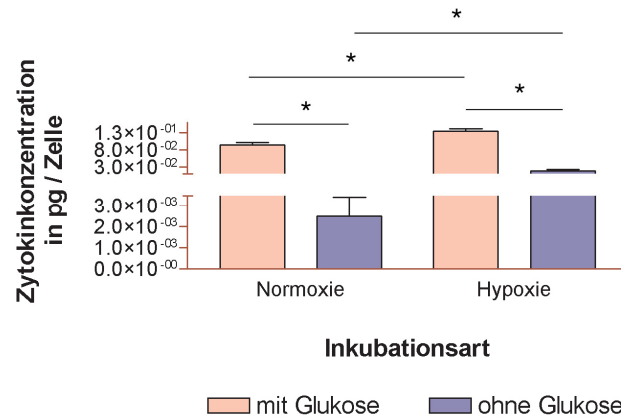
4. Eine vierte Art von Expressionsprofil ist das von MCAF (**Abbildung 13**). Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von Glukose auf die Expressionsstärke von MCAF, und ein schwacher aber signifikanter Hypoxieeinfluss lässt sich lediglich unter der Wirkung von Glukose beobachten.

### Kategorie 1:

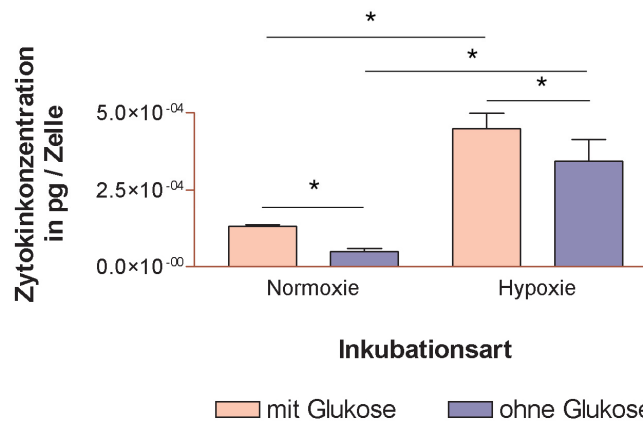


**Abbildung 7** Interleukin-1 $\beta$ -Konzentration in pg bezogen auf die Zellzahl im Vergleich zwischen den Inkubationsbedingungen: Fehlerbalken als SEM; signifikante Unterschiede markiert mit \* - (p < 0,05)

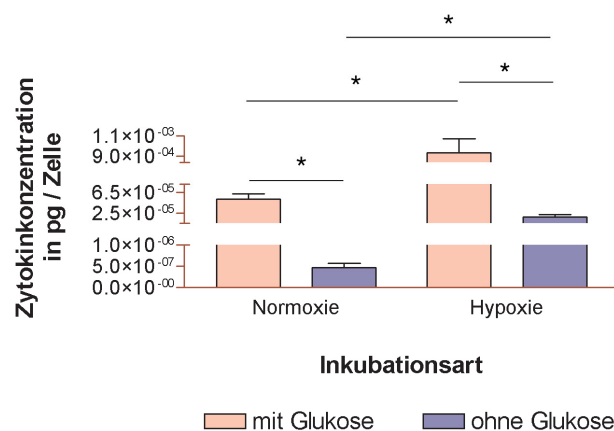
## Ergebnisse



**Abbildung 8** Darstellung der Interleukin-2-Konzentration in pg bezogen auf die Zellzahl im Vergleich zwischen den Inkubationsbedingungen: Fehlerbalken als SEM; signifikante Unterschiede markiert mit \* - ( $p < 0,05$ )



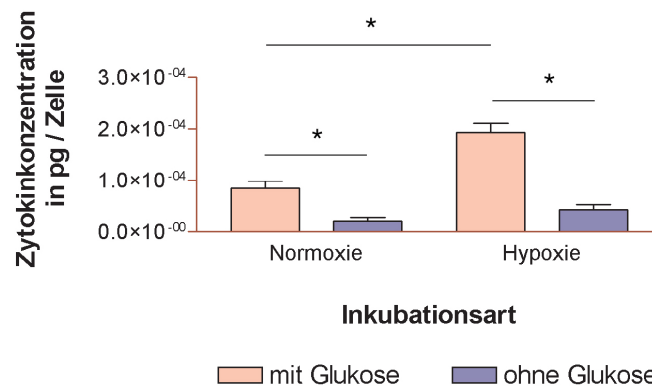
**Abbildung 9** Interleukin-8-Konzentration in pg bezogen auf die Zellzahl im Vergleich zwischen den Inkubationsbedingungen: Fehlerbalken als SEM; signifikante Unterschiede markiert mit \* - ( $p < 0,05$ )



**Abbildung 10** Interleukin-10-Konzentration in pg bezogen auf die Zellzahl im Vergleich zwischen den Inkubationsbedingungen: Fehlerbalken als SEM; signifikante Unterschiede markiert mit \* - ( $p < 0,05$ )

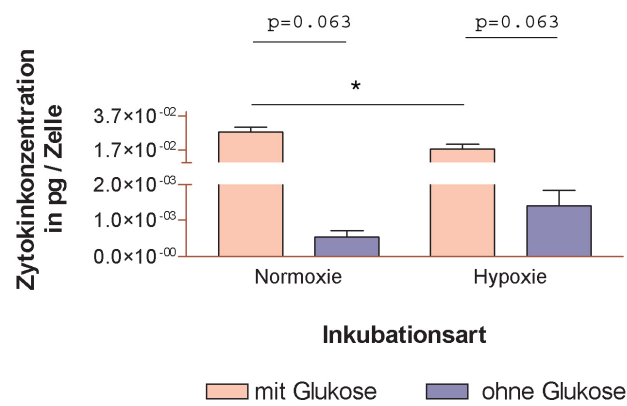
## Ergebnisse

### Kategorie 2:



**Abbildung 11** Interleukin-6-Konzentration in pg bezogen auf die Zellzahl im Vergleich zwischen den Inkubationsbedingungen: Fehlerbalken als SEM; signifikante Unterschiede markiert mit \* - ( $p < 0,05$ )

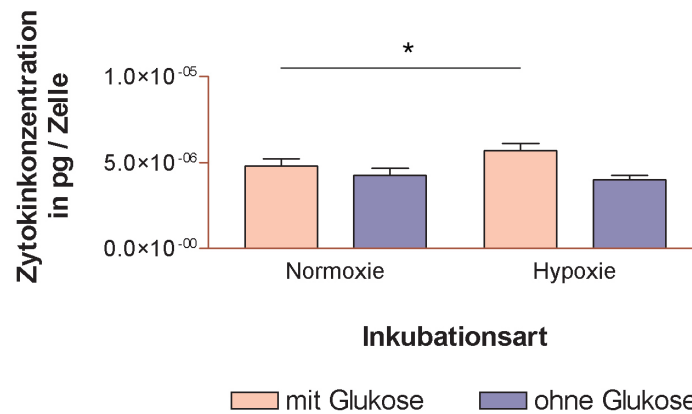
### Kategorie 3:



**Abbildung 12** TNF- $\alpha$ -Konzentration in pg bezogen auf die Zellzahl im Vergleich zwischen den Inkubationsbedingungen: Fehlerbalken als SEM; signifikante Unterschiede markiert mit \* - ( $p < 0,05$ )

## Ergebnisse

### Kategorie 4:



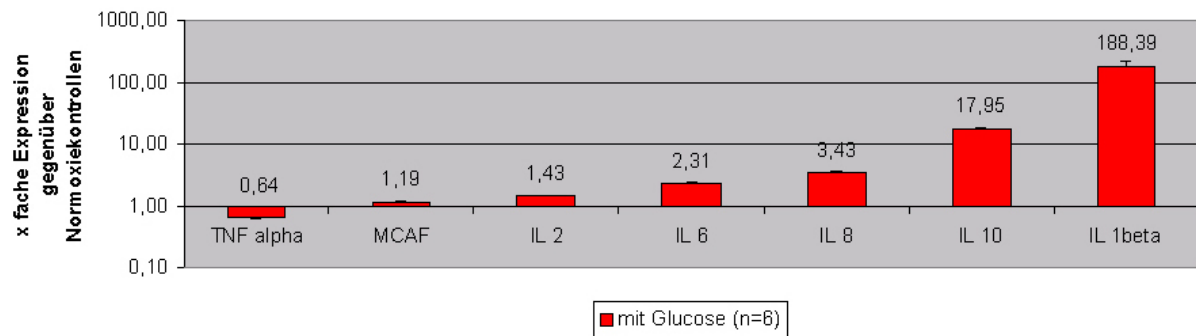
**Abbildung 13** MCAF (MCP-1)-Konzentration in pg bezogen auf die Zellzahl im Vergleich zwischen den Inkubationsbedingungen: Fehlerbalken als SEM; signifikante Unterschiede markiert mit \* - ( $p < 0,05$ )

Bezieht man die Expressionsstärken der Zytokine unter Hypoxie auf die Expressionsstärken unter Normoxie, dann ergeben sich die **Abbildungen 14 und 15**. Hier werden die Quotienten aus Hypoxieexpression und Normoxieexpression dargestellt. Das Ausmaß des Hypoxieeinflusses ergibt sich aus folgender Gleichung, wobei die Variable  $c$  die Konzentration des Zytokins darstellt:

$$\text{Einfluss von Hypoxie} = \frac{c(\text{Zytokin unter Hypoxie})}{c(\text{Zytokin unter Normoxie})}$$

## Ergebnisse

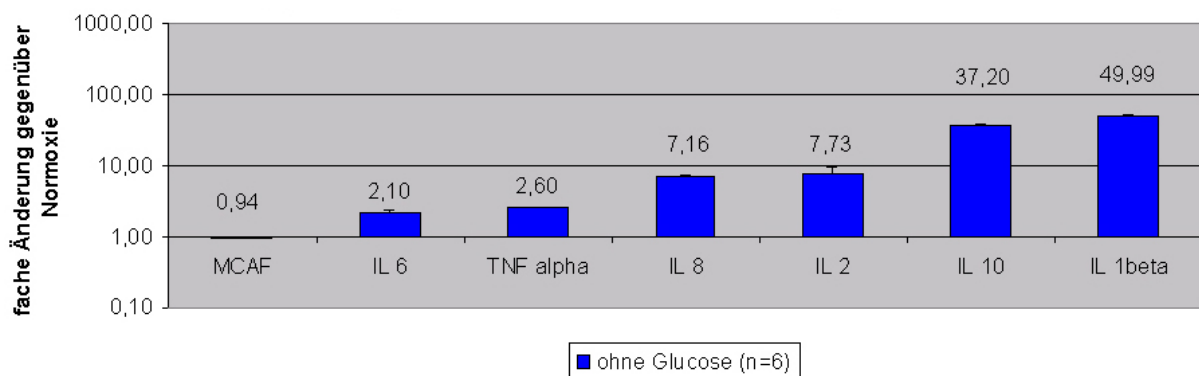
**Abbildung 14** zeigt berechneten Quotienten im Medium mit Glukose.



**Abbildung 14** Hypoxieeinfluss auf die Expression der dargestellten Zytokine im Medium mit Glukose bei stimulierten  $CD4^+$ -Zellen. Fehlerbalken repräsentieren SEM; Hypoxieeinfluss = Hypoxieexpression / Normoxieexpression

Aus dieser Art der Darstellung wird eine Hierarchie der verschiedenen Zytokine erkennbar. IL-1 $\beta$  stellt sich hierbei als am stärksten durch Hypoxie beeinflusstes Zytokin dar. Ihm folgen IL-10, IL-8, IL-6, IL-2 und MCAF. TNF- $\alpha$  ist ein durch Hypoxie negativ beeinflusstes Zytokin. Alle dargestellten Effekte sind signifikant ( $p < 0,05$ ). Unter diesen Umständen kann man IL-1 $\beta$  und IL-10 als hochgradig, IL-8 und IL-6 als mittelgradig, IL-2 und MCAF als geringgradig und TNF- $\alpha$  als negativ beeinflusst bewerten.

**Abbildung 15** zeigt berechneten Quotienten im Medium ohne Glukose.

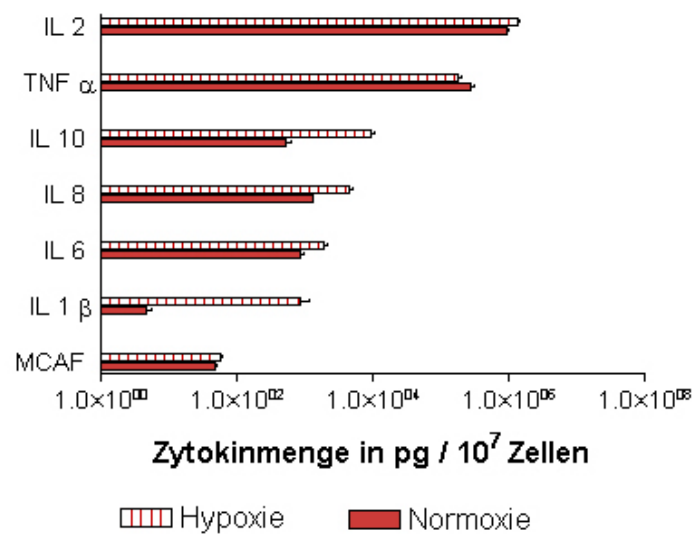


**Abbildung 15** Hypoxieeinfluss auf die Expression der dargestellten Zytokine im Medium ohne Glukose bei stimulierten  $CD4^+$ -Zellen. Fehlerbalken repräsentieren SEM; Hypoxieeinfluss = Hypoxieexpression / Normoxieexpression

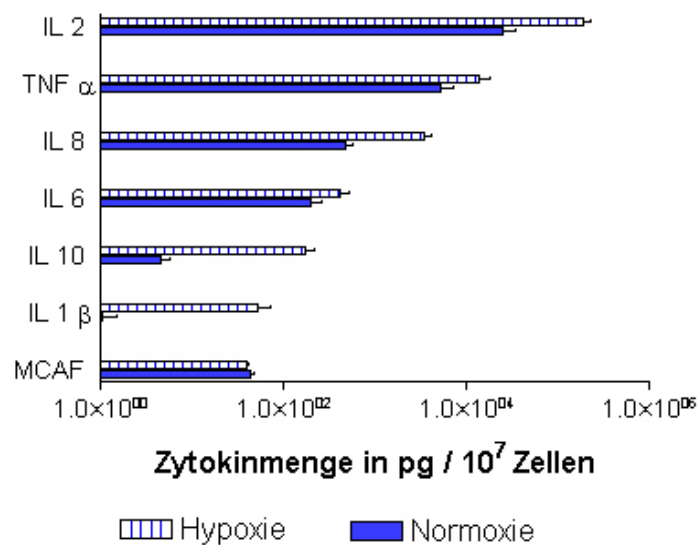
Sowohl im Medium mit Glukose als auch bei Glukoseabwesenheit zeigt sich ein großer Einfluss der Hypoxie auf die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-2, IL-8. Der Einfluss auf die

## Ergebnisse

Expression von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und MCAF ist jedoch nicht signifikant. Somit stellen sich IL-10 und IL-1 $\beta$  als stark, IL-2 und IL-8 als mittelgradig und die anderen Zytokine als nicht oder geringgradig hypoxiereguliert dar. In den folgenden **Abbildungen 16 und 17** sind zum Vergleich die Absolutwerte der Zytokinsynthese unter den unterschiedlichen Bedingungen dargestellt. Da in der Expressionsstärke starke quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Zytokinen existieren, ist die Ordinate in logarithmischer Form skaliert.



**Abbildung 16a** Expressionsprofil PMA- / Ionomycin-stimulierter CD4<sup>+</sup>-Zellen unter Einfluss von Glukose: Zytokinmenge in pg bezogen auf 10<sup>7</sup> Zellen; Fehlerbalken repräsentieren SEM (n=6)





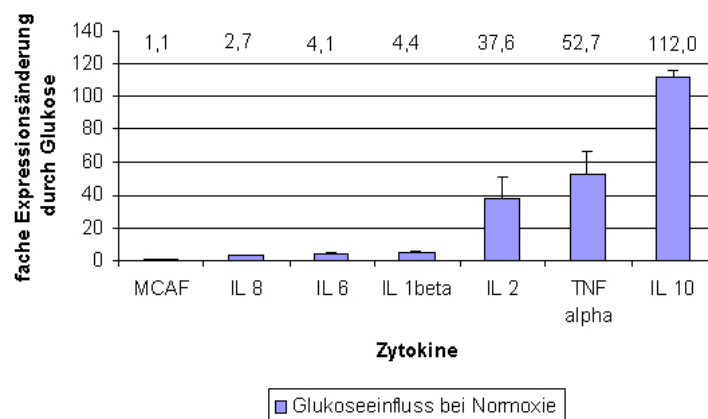
## Ergebnisse

**Abbildung 16b** Expressionsprofil PMA- / Ionomycin-stimulierter CD4<sup>+</sup>-Zellen unter Glukosemangel: Zytokinmenge in pg bezogen auf 10<sup>7</sup> Zellen; Fehlerbalken repräsentieren SEM (n=6)

Man kann feststellen, dass die Zellen unter Glukoseeinfluss insgesamt größere Zytokinmengen produzieren. In ihrem Expressionsprofil zeigen sie, was die Mengenverteilung dieser Zytokine anbelangt, jedoch glukoseunabhängig ähnliche Muster. Aus der **Abbildung 16a** lässt sich entnehmen, dass die Zytokine IL-2 und TNF- $\alpha$  sehr stark exprimiert werden ( $> 5 \times 10^3$  pg / 10<sup>7</sup> Zellen), IL-10, IL-8 und IL-6 im mittleren Expressionsbereich liegen ( $> 5 \times 10^2$  pg / 10<sup>7</sup> Zellen) und IL-1 $\beta$  und MCAF eher im unteren Expressionsbereich zu finden sind ( $< 5 \times 10^2$  pg / 10<sup>7</sup> Zellen). Die Situation unter Glukosemangel, die in **Abbildung 16b** dargestellt ist, ergibt insgesamt niedrigere Expressionen für alle Zytokine. Hier gelten IL-2 und TNF- $\alpha$  als hoch exprimierte Zytokine, während IL-8, IL-6 und IL-10 auf mittlerem Niveau produziert und IL-1 $\beta$  und MCAF wiederum auf niedriger Stufe ausgeschüttet werden. Es stellte sich die Frage, welchen Einfluss Glukose auf die Zytokinexpression hat. Daher ergab sich die Notwendigkeit, die Expression unter jeweils Normoxie bzw. Hypoxie unter Glukosean- und ~abwesenheit miteinander zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurde der folgende Quotient berechnet:

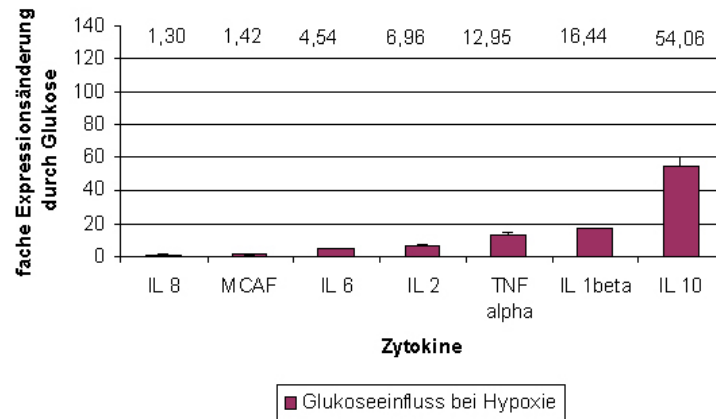
$$\text{Einfluss}_{\text{Glukose}} = \frac{\text{Expression mit Glukose} \cdot}{\text{Expression ohne Glukose}}$$

In den folgenden zwei Abbildungen sind diese Quotienten dargestellt.



**Abbildung 17a** Einfluss von Glukoseverfügbarkeit auf die Zytokinexpression unter Normoxie (n=6)

## Ergebnisse



**Abbildung 17b** Einfluss von Glukoseverfügbarkeit auf die Zytokinexpression unter Hypoxie (n=6)

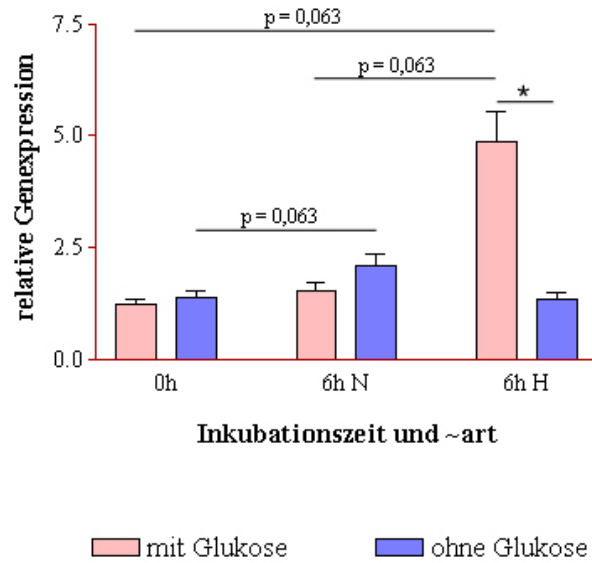
Aus den Abbildungen geht ein starker Einfluss von Glukose auf die Expression von IL-10 hervor, der bei Normoxie am stärksten ist. Unter Normoxie stellen sich auch TNF- $\alpha$  und IL-2 als stark von Glukose beeinflusst dar, während unter Hypoxie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  als deutlich beeinflusst angesehen werden können.

### 3.6 Light Cycler PCR für Superoxiddismutase1, Hexokinase und $\beta$ -Aktin

Die Bestimmung der mRNA-Expression für die Enzyme Hexokinase und Superoxiddismutase-1 erfolgte mit der Fragestellung, welchen Einfluss Hypoxie auf die Transkription von Schlüsselgenen der Glykolyse (Hexokinase) und des Radikalstoffwechsels (Superoxiddismutase-1) hat. Es bestand die Arbeitshypothese, dass auch in Lymphozyten eine Erhöhung der Transkription des Hexokinasegens unter dem Einfluss von Glukose auftritt. Der Radikalstoffwechsel sollte in einer sauerstoffreichen Umgebung ohne Glykolyse am intensivsten sein.

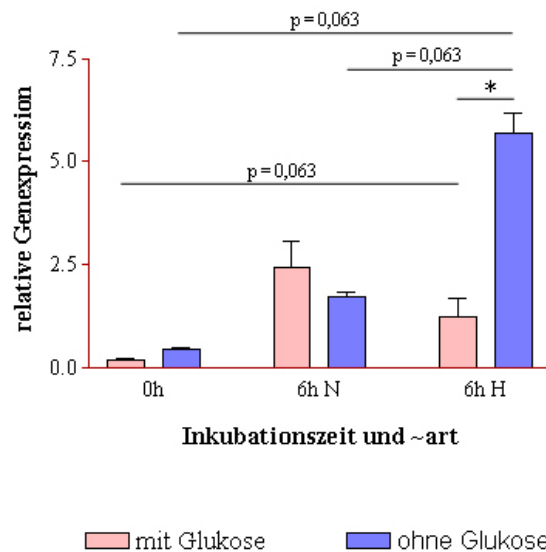
Die folgenden Abbildungen illustrieren unsere Ergebnisse zu Art und Ausmaß dieser Hypoxieanpassung auf transkriptioneller Ebene.

## Ergebnisse



**Abbildung 18** mRNA Expression von Hexokinase in stimulierten humanen CD4<sup>+</sup>-Zellen: Darstellung der mRNA Expression von Hexokinase (Transkriptvarianten 1-5) zu Beginn (0h), nach sechs Stunden Normoxie (N6h) und Hypoxie (H6h), normalisiert auf  $\beta$ -Aktin im Vergleich zwischen glukosereichen und glukosefreien Inkubationsbedingungen; Fehlerbalken repräsentieren SEM; (n=4); (\*-p < 0,05)

**Abbildung 18** widmet sich der Fragestellung, ob die Expression des Hexokinasegens durch Hypoxie und Glukosemangel beeinflusst werden. Man kann erkennen, dass Hypoxie im Medium mit Glukose zu einer signifikanten Transkriptionssteigerung des Hexokinasegens führt. Unter Normoxie zeigt sich sowohl im Medium mit Glukose als auch im Medium ohne Glukose keine signifikant gesteigerte Transkription im Vergleich zum Ausgangswert.



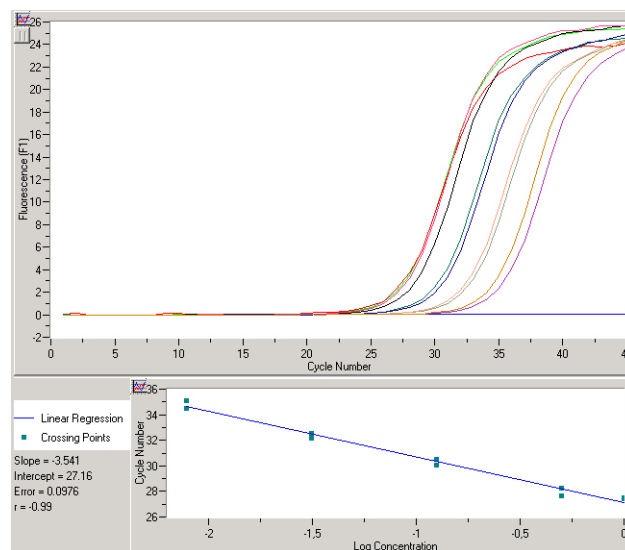
**Abbildung 19** mRNA Expression von Superoxiddismutase-1 (Cu/Zn) in stimulierten humanen CD4<sup>+</sup>-Zellen: Darstellung der mRNA Expression von Superoxiddismutase-1 zu Beginn (N0h), nach sechs Stunden Normoxie

## Ergebnisse

(N6h) und Hypoxie (H6h), normalisiert auf  $\beta$ -Aktin im Vergleich zwischen glukosereichen und glukosefreien Inkubationsbedingungen; Fehlerbalken repräsentieren SEM; (n=4); (\*-p < 0,05)

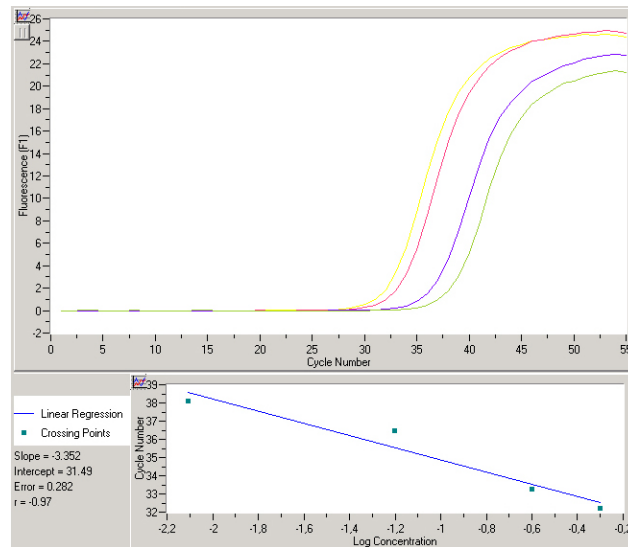
**Abbildung 19** gibt Antwort auf die Frage, inwieweit das Superoxiddismutase-1-Gen transkriptionell durch den Einfluss von Sauerstoff- und Glukosemangel beeinflusst wird. Es ist eine signifikante Steigerung der Transkription von Superoxiddismutase-1 unter der Kombination aus Sauerstoff- und Glukosemangel erkennbar.

Die folgenden vier **Abbildungen 20-23** dokumentieren die Etablierung der PCR Reaktionsläufe am Light Cycler. Hier war es zuerst nötig, die geeigneten Reaktionsbedingungen wie Temperatur und Magnesiumchloridkonzentration in den Reaktionsgemischen festzustellen, da diese für jede Primerpaarkombination unterschiedlich ausfallen können. Mit diesen Temperatur- und  $MgCl_2$ -Konzentrationseinstellungen war es nun möglich, eine Verdünnungsreihe von cDNA mit dem geeigneten Programm einer PCR zu unterziehen. Die Ergebnisse hierzu finden sich in den folgenden Abbildungen:



**Abbildung 20** Effizienzreihe zur PCR von Superoxiddismutase-1: Es ergibt sich eine Effizienz von 1,916. Die Messungen sind Doppelwerte einer Standardverdünnungsreihe.

## Ergebnisse



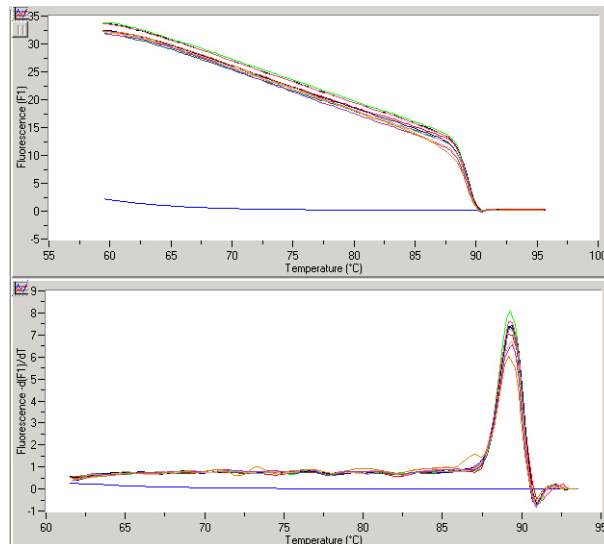
**Abbildung 21** Effizienzbestimmung Hexokinase 1 TV1-5 am Light Cycler System ; Effizienz 1,987. Die Messungen sind Einzelbestimmungen einer Standardverdünnungsreihe, die sich in mehreren folgenden Läufen bestätigt haben.

Die Effizienz wurde durch folgende Formel bestimmt:

$$Effizienz = 10^{\left(-\frac{1}{Slope}\right)}$$

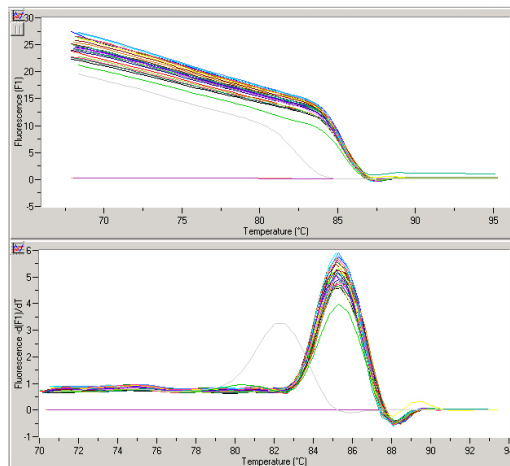
## Ergebnisse

Der Terminus „Slope“ gibt den Anstieg der blauen Geraden aus den **Abbildungen 20 und 21** an. Die Effizienz gibt an, wie viele Kopien des zu amplifizierenden Produktes pro PCR-Zyklus erzeugt werden. Im Idealfall ergibt sich eine Verdopplung, also eine Effizienz von zwei. Um die Aussagen über die Effizienzläufe aus den **Abbildungen 20 und 21** zu validieren, müssen die Schmelzkurven der entstandenen Produkte kritisch beurteilt werden. Dazu wurden die Produkte unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung der Proben erwärmt. Da Sybr Green als Farbstoff seine Emissionsintensität verliert, sobald einzelsträngige DNA vorliegt, ist es möglich zu beurteilen, ob in den Proben tatsächlich nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Es ist sogar möglich, dessen genaue Schmelztemperatur zu bestimmen. Diese Messungen sind in den **Abbildungen 22 und 23** wiedergegeben.



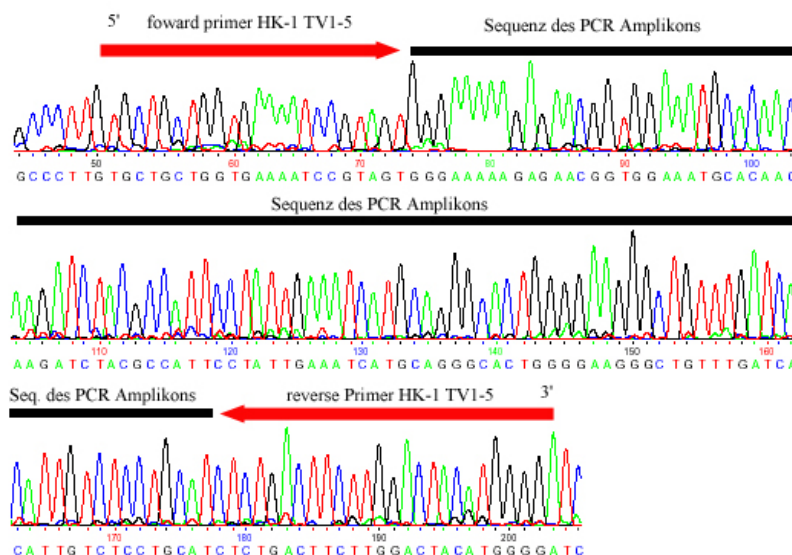
**Abbildung 22** Schmelzkurve zur Effizienzbestimmung von Superoxiddismutase-1. Es zeigt sich ein spezifisches Produkt mit einer Schmelztemperatur von ca. 89°C. Die Wasserkontrolle bleibt produktfrei.

## Ergebnisse



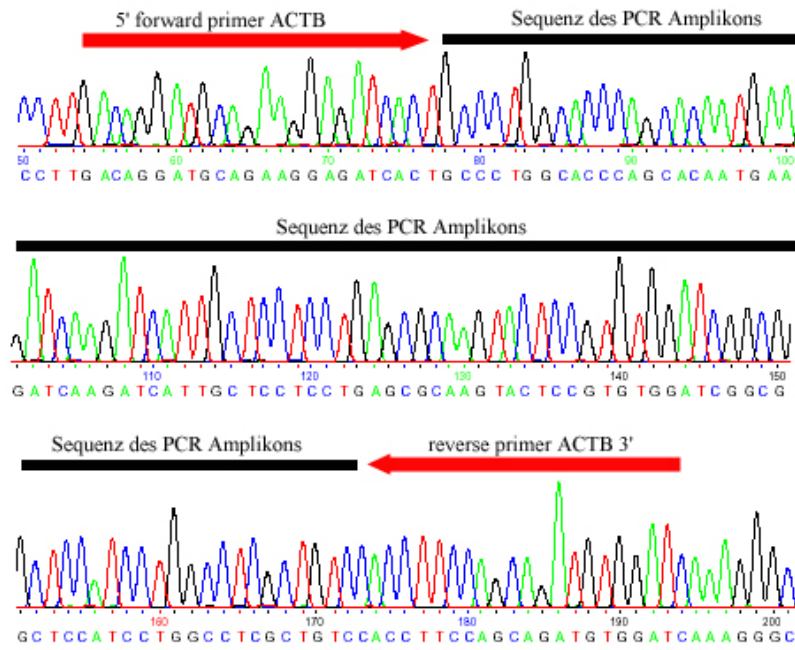
**Abbildung 23** Schmelzkurven zur Effizienzbestimmung für Hexokinase 1 TV1-5. Es zeigt sich ein spezifisches Produkt mit einer Schmelztemperatur von ca. 85,5°C. Ein weiteres Produkt bei 82°C tritt nur in der Wasserkontrolle auf und ist für die eigentlichen Proben und die Effizienzbestimmung nicht von Bedeutung.

Zur Verifizierung der Amplikons für Hexokinase-1, Superoxiddismutase-1 und  $\beta$ -Aktin müssen die jeweiligen PCR Produkte sequenziert werden. In den folgenden **Abbildungen 24-26** sind die Sequenzierungsergebnisse dargestellt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass alle Sequenzen den gewünschten Amplikons entsprechen und somit die auf Grundlage der Realtime-PCR ermittelten Ergebnisse valide sind.



**Abbildung 24** Sequenzierungsergebniss für das Hexokinase-1 Amplikon

## Ergebnisse



**Abbildung 25** Sequenzierungsergebniss für das  $\beta$ -Aktin (ACTB) Amplikon



## Ergebnisse

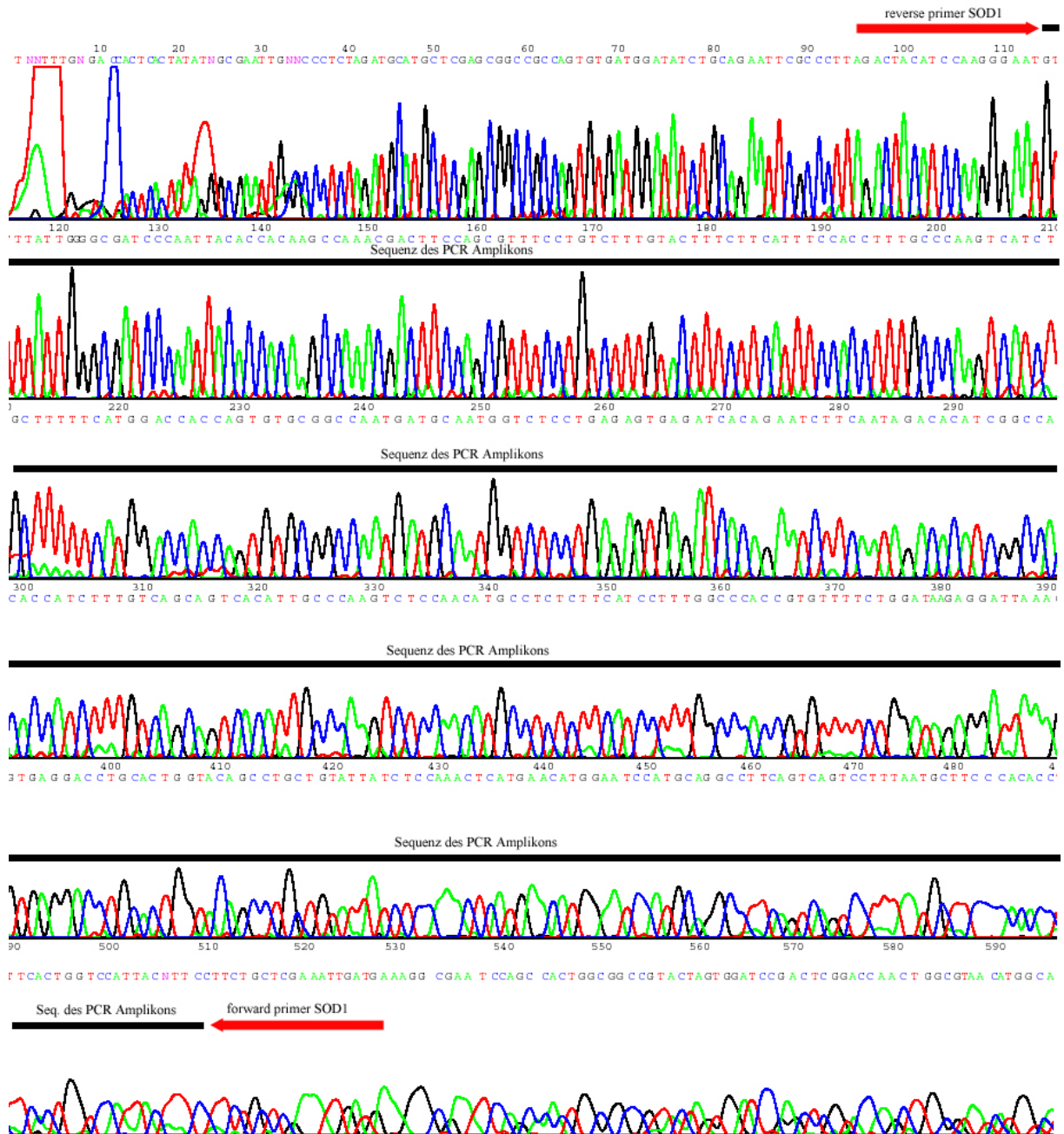


Abbildung 26 Sequenzierungsergebniss für das SOD1 Amplikon

### 3.7 Korrelationsanalysen

Aus den Ergebnissen der Zytokinmessungen ergaben sich Fragen zu möglichen Zusammenhängen zwischen den Zytokinen untereinander und verschiedenen ausgesuchten Einflussfaktoren auf die Zytokinproduktion. Um Anhaltspunkte für die Beantwortung der Fragen zu möglichen Zusammenhängen zu erhalten, wurden die Zytokindaten einer Korrelationsanalyse unterzogen. Die Ergebnisse dieser Analyse finden sich in tabellarischer Form in den folgenden Abschnitten getrennt nach Glukoseanwesenheit bzw. ~abwesenheit.

#### 3.7.1 Experimente mit glukosehaltigem Medium

Die nachfolgenden zwei Tabellen zeigen die Korrelationsdaten zu signifikant korrelierenden Zytokinkombinationen (**Tabelle 3a**) und die Daten zur Korrelation zwischen der Population der schwach CD4<sup>+</sup>-Zellen und einzelner Zytokine (**Tabelle 3b**).

**Tabelle 3a:** Korrelationsbestimmung für mögliche Zytokinabhängigkeiten nach Pearson (lineare Korrelation) Darstellung aller signifikanten Korrelationen für die Inkubation im Medium mit Glukose mit Angabe des Korrelationskoeffizienten und der Signifikanz

Korrelationspartner	Koeffizient	Signifikanz	Bemerkung
IL2:TNF $\alpha$	0,82	0,046	nur bei Normoxie
IL-8:TNF $\alpha$	0,87	0,024	nur bei Normoxie

**Tabelle 3b:** Korrelationsbestimmung nach Pearson (linear) Möglichkeit der Auswirkung der CD4<sup>low</sup>-Population auf die Zytokinexpression im glukosehaltigen Medium

Korrelationspartner	Koeffizient	Signifikanz	Bemerkung
CD4 <sup>low</sup> : IL1 $\beta$	0,955	0,003	bei Normoxie und Hypoxie
	0,941	0,005	
CD4 <sup>low</sup> : IL-8	0,846	0,034	nur bei Hypoxie

Man kann in **Tabelle 3a** einen Zusammenhang zwischen den IL-2- und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen sowie den IL-8- und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen unter Normoxie erkennen. Aus **Tabelle 3b** geht eine signifikant positive Korrelation zwischen der Zahl der schwach positiven CD4-Zellen (CD4<sup>low</sup>) und der Expression von IL-8 unter dem Einfluss von Hypoxie hervor. Die Expression von IL-1 $\beta$  korreliert unabhängig von der Sauerstoffversorgung mit der Zahl der CD4-positiven Zellen.

### 3.7.2 Experimente mit glukosefreiem Medium

In den folgenden zwei Tabellen sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse für die Inkubation in glukosefreiem Medium dargestellt. **Tabelle 4a** zeigt die signifikant korrelierenden Zytokine, während in **Tabelle 4b** der korrelative Zusammenhang zwischen der Population schwach CD4-positiver Zellen und einzelnen Zytokinen dargestellt ist.

**Tabelle 4a** Korrelationsbestimmung nach Pearson (lineare Korrelation) für Glukosemangel: Darstellung aller signifikanten Korrelationen

Korrelationspartner	Koeffizient	Signifikanz	Bemerkung
IL-6 : IL-2	0,845	0,034	nur bei Normoxie
IL-6 : IL1 $\beta$	0,854	0,031	nur bei Normoxie
IL-8 : MCAF	0,826	0,043	nur bei Normoxie
TNF $\alpha$ : IL-2	0,881 0,847	0,02 0,033	bei Normoxie und <i>Hypoxie</i>

**Tabelle 4b** Korrelationsbestimmung nach Pearson (lineare Korrelation) für Glukosemangel: Darstellung aller signifikanten Korrelationen im Zusammenhang mit schwach CD4+-Zellen (CD4<sup>low</sup>)

Korrelationspartner	Koeffizient	Signifikanz	Bemerkung
CD4 <sup>low</sup> : IL-8	0,903 0,825	0,014 0,043	bei Normoxie und <i>Hypoxie</i>
CD4 <sup>low</sup> : IL-1 $\beta$	0,944	0,005	nur bei Hypoxie

Aus **Tabelle 4a** kann man entnehmen, dass es unter Normoxie einen positiven Zusammenhang zwischen der IL-6-Konzentration und den Konzentrationen von IL-2 bzw. IL-1 $\beta$  gibt. Die IL-8- und die MCAF-Konzentrationen scheinen unter normoxischen Bedingungen ebenfalls verbunden. Die TNF- $\alpha$  Produktion korreliert unabhängig von der Sauerstoffversorgung mit der IL-2 Konzentration. Aus **Tabelle 4b** kann man entnehmen, dass sich unter hypoxischen Bedingungen eine positive Korrelationen zwischen der Konzentration an CD4<sup>low</sup>-Zellen und der IL-1 $\beta$  Produktion zeigt. Die Berechnungen ergaben ferner, dass eine positive Korrelation zwischen Anzahl der CD4<sup>low</sup>-Zellen und der IL-8 Konzentration sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie besteht.

#### 4 Diskussion

Metabolische Energie ist bedeutsam für die Auseinandersetzung von Körperzellen mit ihrer Umwelt. Die Energiegewinnung aus Glukose durch die Glykolyse und die Prozesse in der mitochondrialen Atmungskette sind von entscheidender Bedeutung für die Funktionsfähigkeit und das Überleben der Zelle. Beide Stoffwechselwege liefern hierbei den Energieträger ATP mit unterschiedlicher Effizienz. In besonderem Maße sind die Zellen des Immunsystems, zu denen die untersuchten  $CD4^+$ -Zellen gehören, vom lokalen Angebot an Sauerstoff und Glukose im Entzündungsgebiet betroffen. Sauerstoffspannungen in humanen Lymphknoten sind bislang nicht untersucht. Es existieren jedoch Messdaten aus Mausexperimenten, die vermutlich auch bei Menschen zu erwarten sind. So finden sich verminderte Sauerstoffspannungen zwischen 0,5 % (v/v) und 4,5 % (v/v) in Lymphknoten und lymphoiden Organen von Mäusen (54). Physiologisch zeigt sich in Thymusgewebe von Mäusen eine niedrige Sauerstoffspannung ( $\sim 10\text{mmHg}$ ;  $\sim 7\%(v/v)$ ). Sie wird als ein Regulationsmechanismus angesehen, der Bestandteil der Lymphozytenselektion im Thymus ist. Die Selektion ist wichtig, weil nur an Hypoxie adaptierte T-Lymphozyten in der Lage sind, ihrer Funktion im Entzündungsgebiet nachzukommen (55). Erkrankungen mit entzündlichem Charakter, wie zum Beispiel RA, zeichnen sich durch eine hohe Infiltrationsrate von  $CD4^+$ -Zellen in das Synovialgewebe aus. Giatromonolaki et al. konnten zeigen, dass neben Zellen der Synovialis auch die zellulären Infiltrate bei RA in vermehrtem Maße HIF-1 $\alpha$  positiv sind (16). Dies lässt vermuten, dass bei Patienten mit RA im Entzündungsgebiet ein vermindertes Sauerstoffangebot herrscht. Die Präsenz von HIF-1 $\alpha$  im Entzündungsgebiet reicht jedoch nicht aus, um von einer hypoxischen Umgebung auszugehen, da dieser Faktor auch unter normoxischen Bedingungen durch den Einfluss von beispielsweise Eisenmangel stabilisiert werden kann. Eine andere Forschergruppe um Lund-Olesen konnte 1970 eine signifikant verminderte Sauerstoffkonzentration in Kniegelenkspunktaten von Patienten mit RA gegenüber Patienten mit Osteoarthritis oder Unfallopfern feststellen (56). Diese Untersuchung stellt einen direkten Nachweis von Hypoxie im Gelenk von RA-Patienten dar. Einen weiteren Beweis zwischen Ödem und Hypoperfusion stellt die Arbeit von Wallis et al. dar (57). Diese Gruppe wies eine verminderte Iodclearance aus ödematös geschwollenen Gelenken von RA Patienten nach. Somit kann man zusammenfassend sagen, dass hypoxische Zustände im Körper unter physiologischen und pathologischen Bedingungen auftreten können, und dass T-Lymphozyten in solchen Regionen anzutreffen sind. Es ist daher notwendig, das Verhalten von  $CD4^+$ -Zellen unter Bedingungen zu betrachten, wie sie sich im frisch entzündeten

Gewebe finden. Im vorliegenden *in-vitro*-Modell entspricht dies anfangs dem Zustand der Stimulation unter freiem Sauerstoffangebot und bei guter Glukoseverfügbarkeit und endet dann im Zustand mit geringem Glukose- und Sauerstoffangebot. *In vivo* kann man diese Bedingungen perivaskulär im Entzündungsgebiet finden.

### 4.1 Verhalten von CD4<sup>+</sup>-Zellen in unterschiedlichen Situationen

#### 4.1.1 Verhalten von CD4<sup>+</sup>-Zellen bei Normoxie im glukosehaltigen Medium unter Stimulation

Im glukosehaltigen Medium bei guter Sauerstoffversorgung und Stimulierung mit PMA und Ionomycin ist HIF-1 $\alpha$  nicht nachweisbar. Die Zellen zeigen eine Überlebensrate von  $81 \pm 11$  % nach sechs Stunden Inkubation. Der ATP-Gehalt liegt bei ca.  $0,85 \pm 0,27$  nmol ATP pro  $10^7$  Zellen. Die Hierarchie der Zytokine zeigt IL-2 und TNF- $\alpha$  als hoch, IL-8, IL-6 und IL-10 als mittelgradig und MCAF und IL-1 $\beta$  als gering exprimiert. In dieser Situation ist die Transkription des Hexokinasegens nach sechs Stunden mit der initialen Transkriptionsstärke vergleichbar, während die Transkription der SOD1 tendenziell ( $p < 0,063$ ) stärker als zu Beginn des Experiments ist. Die Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$  ist durch den normoxischen Zustand zu erklären. Dieser ermöglicht es den Prolylhydroxylasen, wie schon in der Einleitung zu diesem Transkriptionsfaktor (*Abschnitt 1.4*) beschrieben, das Protein zu hydroxylieren. Das so veränderte HIF-1 $\alpha$  wird danach ubiquitiniert und proteasomal degradiert. Die Überlebensrate von 80% ist vermutlich auf das Vorhandensein von Glukose zurückzuführen. Die Rolle von Glukose ist nicht nur auf die eines energieliefernden Moleküls reduzierbar. Vielmehr ist sie über den pentoseliefernden Hexosemonophosphatweg an der Nukleotidbiosynthese und der Produktion von NADPH/H<sup>+</sup> beteiligt. Dieses Molekül ist in der Lage, Glutathion-disulfid zu Glutathion zu reduzieren, und dadurch einen Schutz der Thiolgruppen von Membranproteinen vor der Oxidation durch Sauerstoffradikale zu garantieren. Man kann vermuten, dass die Bereitstellung von Energie in Form von ATP, die Gewährleistung der Nukleotidbiosynthese und die Aufrechterhaltung des antioxidativen Status der Zellen zu dieser Überlebensrate führt. CD4<sup>+</sup>-Zellen nehmen in der HIV-Forschung als Wirtszellen für das HI-Virus einen wichtigen Stellenwert ein. Über die Rolle des Mangels an antioxidativen Substanzen und Enzymkomplexen und ihrer Korrelation mit der CD4<sup>+</sup>-T-

Lymphozytendepletion in AIDS-Patienten gibt es jedoch bislang nur Hypothesen. Das Vorhandensein einer geringen Menge an Bcl-2 als anti-apoptotisches und antioxidatives Protein in CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten von AIDS-Patienten, ein Rückgang der Apoptoserate unter Behandlung mit Antioxidantien sowie der Nachweis von makrophagenassoziierten pro-oxidativen und pro-apoptotischen Zytokinen lassen auf eine große Sensibilität der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten auf oxidativen Stress und eine Dysregulation unter AIDS schließen (58). Die starke Präsenz der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und TNF- $\alpha$  sowie IL-6 und IL-8 ist auf die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin zurückzuführen. PMA wird hierbei als Analogon zum physiologisch wirksamen Diacylglycerol (DAG) eingesetzt und führt wie DAG selbst zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Das Auftreten von IL-2 in großen Mengen lässt auf eine große T<sub>H</sub>1-Fraktion in der Zellsuspension schließen. Dies würde bedeuten, dass die naiven T-Lymphozyten unter Stimulation durch PMA und Ionomycin in einen vorwiegend IL-2 produzierenden Zustand polarisiert werden. Dies konnte durch Long et al. gezeigt werden (59). Die Tatsache, dass IL-2 stimulationsbedingt hoch exprimiert wird, lässt sich durch folgenden Artikel von Dreikhausen et al. belegen. Dieser Gruppe ist es gelungen, zwischen der Aktivierung der Proteinkinase-C- $\beta$  (PKC- $\beta$ ) und der Expression von IL-2 einen Zusammenhang herzustellen. Demzufolge ist die PKC- $\beta$  für die Phosphorylierung der Jun-N-terminal-kinase (JNK) verantwortlich. Die JNK-Kaskade ihrerseits bewirkt die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors N-FAT und dessen Bindung an die Promotorregion des IL-2-Gens (60). Dies führt zu einer verstärkten Expression von IL-2. Diesen Mechanismus kann man auch für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten CD4<sup>+</sup>-Zellen annehmen, da bei ihnen durch PMA-Stimulation die Proteinkinase-C verstärkt aktiv war. Eine Abhängigkeit zwischen den Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  der PKC und der Produktion von TNF- $\alpha$  sowie der PKC-zeta und IL-10 konnte durch Foey et al. demonstriert werden (61). Mit einer Suppressionsanalyse der IL-8 Expression wurde indirekt durch Na et al. gezeigt, dass PMA, als Aktivator der Proteinkinase-C für eine vermehrte Expression von IL-8 verantwortlich ist. Diese Gruppe untersuchte die Wirkung des Fungizids Radicicol auf die Expression von IL-8 durch Monozyten. Es zeigten sich eine Unterdrückung der p38 / ERK1 & 2 Signalkaskade und eine verminderte Bindung der PKC abhängigen Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B und AP-1 in der Promotorregion des IL-8 Gens (62). Durch Schaerli et al. konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten aus peripherem Blut IL-8 exprimieren können (35). Kim et al. bestätigten

die Aussage einer PKC-Abhängigkeit für TNF- $\alpha$  und stellten auch für IL-6 und IL-1 $\beta$  in Leukozyten aus peripherem Blut einen Einfluss der PKC auf die Expression dieser Zytokine fest. Diese Erkenntnisse gewannen sie aus Infektionsversuchen von peripheren Leukozyten mit *Anaplasma phagocytophila*, einem obligat intrazellulären Bakterium in Granulozyten, welches als Erreger der humanen granulozytären Ehrlichiose gilt (63). Somit kann man schlussfolgern, dass die beobachtete Expression der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IL-10 infolge der Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA eintritt und somit einen Stimulationseffekt darstellt. Es stellen sich nun die Fragen, inwieweit sich die Sauerstoffversorgung und das Angebot an Glukose auf (a) die Produktion von ATP, (b) das Überleben der Zellen und (c) die Expression der betrachteten Zytokine auswirken. Zunächst soll hierbei der Entzug von Sauerstoff, also die Auswirkungen einer hypoxischen Umgebung auf diese Zellfunktionen, betrachtet werden.

### 4.1.2 Auswirkungen von Hypoxie in glukosehaltigem Medium unter Stimulation

Die Untersuchung des Zellverhaltens unter Hypoxie bei ausreichender Glukoseverfügbarkeit diene primär dazu, einen definierten Datensatz zu erhalten, der sich mit den anderen Situationen vergleichen lässt. Die beschriebene Situation mit Hypoxie, Stimulation und Glukoseversorgung kann *in vivo* als äußerst selten angenommen werden. Eine Entsprechung *in vivo* wäre der Zustand nach einer akuten Verschlusssymptomatik in einem Entzündungsgebiet. Je nach Verschlusslokalisation ergeben sich unterschiedliche Krankheitsbilder. Ist die Lungenstrombahn betroffen, handelt es sich um eine Lungenembolie mit akuter Rechtsherzbelastung, Atemnot und kompensatorischer Tachykardie, die bei fulminantem Verlauf mit einem Herzstillstand einhergehen kann. Ist jedoch das intracranielle Gefäßsystem betroffen, ergeben sich je nach Stromgebiet unterschiedliche neurologische Symptome. Physiologischerweise liegt eine Situation mit Hypoxie, ausreichender Glukoseversorgung und aktivierten Lymphozyten im Lymphknoten vor. Aus den Experimenten ergibt sich für diese Situation folgendes Bild. Die stimulierten CD4<sup>+</sup>-Zellen zeigen eine Überlebensrate von  $80 \pm 10 \%$ , welche vergleichbar mit dem in **Abschnitt 4.1.1** besprochenen Zustand ist. Sie weisen nach sechsstündiger Inkubation einen ATP-Gehalt von  $1,12 \pm 0,39 \text{ nmol pro } 10^7 \text{ Zellen}$  auf, und liegen damit signifikant höher als unter normoxischen Bedingungen mit  $0,85 \pm 0,27 \text{ nmol pro } 10^7 \text{ Zellen}$  ( $p=0,031$ ,  $n=6$ ). Aus **Abbildung 4** geht hervor, dass der ATP-Gehalt von in glukosehaltigem Medium inkubierten Zellen anfangs absinkt. Dies kann man als Folge des verstärkten Verbrauchs an ATP durch

Stimulation interpretieren. Als Reaktion auf den verstärkten Verbrauch wird die Synthese von ATP durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung gesteigert. Diese Steigerung ist möglicherweise überschießend und führt zur Einstellung eines neuen ATP-Niveaus. Hypoxie könnte beispielsweise über die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  Einfluss auf diese Veränderung haben, und führt möglicherweise zum beobachteten Unterschied. Ist HIF in vermehrtem Maße vorhanden, so werden die Enzyme der Glykolyse vermehrt exprimiert, was zu einer verstärkten glykolytischen ATP-Produktion führt. Durch Krauss et al. konnte an Thymozyten der Einfluss von Stimulation durch Con A, einem zur spezifischen Stimulation von Thymozyten häufig verwendeten Lectin, auf das Membranpotential der Mitochondrien gezeigt werden. Es stellte sich heraus, dass durch Stimulation der Thymozyten mit Con A die Atmungsrate zunächst anstieg, das mitochondriale Membranpotential bei Zugabe von höheren Konzentrationen jedoch abgesenkt wurde (64). Da für die erhöhte Nachfrage nach ATP während der Stimulation die Aufrechterhaltung eines hohen Membranpotentials erforderlich ist, muss die ATP Synthese somit in verstärktem Maße durch die Glykolyse erfolgt sein. Stimulation bewirkt also nach der Beurteilung dieses Sachverhalts eine Präferenz der Glykolyse als ATP liefernden Stoffwechselweg. Diese Präferenz kann durch die Arbeit von Barnd et al. belegt werden. Diese Gruppe zeigte, dass in proliferierenden Rattenthymozyten, die in glukosehaltigem Medium inkubiert wurden, die ATP Produktion zu über 80 % durch Glykolyse realisiert wurde. Sie vermuteten, dass hierdurch die durch OXPHOS typische ROS-Entstehung vermieden wird (65). Hypoxie scheint sich auf diese Präferenz verstärkend auszuwirken. Welche Mechanismen hierfür eine Rolle spielen, ist noch unklar. Unter hypoxischen Bedingungen im Medium mit Glukose ist in den Zellen eine signifikante Menge des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  nachweisbar. Sie zeigen eine hochgradige Expression von TNF- $\alpha$  und IL-2, eine mittelgradige von IL-10, IL-8, IL-6 und IL-1 $\beta$  und eine niedrige Expression von MCAF. Es ergibt sich eine der Normoxie vergleichbare Zytokinhierarchie. Unterschiede sind jedoch in der Expressionsstärke aller Zytokine nachweisbar. Bis auf TNF- $\alpha$  werden alle Zytokine auf einem signifikant höheren Niveau exprimiert. Hypoxie fördert demzufolge die Expression dieser Faktoren. Im Falle von IL-1 $\beta$  ist dies so stark, dass dieses Protein in der mittleren Expressionskategorie zu finden ist. Bei TNF- $\alpha$  zeigte sich im Gegensatz dazu eine signifikante Verringerung der Expressionsstärke unter Hypoxie. Für die Genexpression von Hexokinase ergab sich eine tendenzielle Transkriptionssteigerung gegenüber Normoxie, während die Transkription von SOD1 nicht



signifikant durch Hypoxie beeinflusst wurde. Unter diesen Bedingungen lassen sich Aussagen über die Sauerstoffverbrauchskinetik der Zellen treffen. Es zeigte sich eine kontinuierliche Atmung, wie in **Abbildung 2** zu erkennen. Der Vergleich dieser Atmungskurven wird im nächsten Abschnitt behandelt. Aus dem Vergleich zwischen der eben behandelten hypoxischen Situation und den normoxischen Bedingungen des vorherigen Abschnittes ergeben sich folgende Fragen:

- 1.) Was ist die Ursache für die vergleichbare Überlebensrate unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen?
- 2.) Ist der beobachtete Hypoxieeinfluss auf die Expression der untersuchten Zytokine auch in anderen Situationen zu beobachten? Wenn dem so ist, welche Mechanismen liegen ihm zu Grunde? Gibt es eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$ ?

Ad 1.) Der Vergleich der Überlebensraten lässt vermuten, dass Glukose einen protektiven Einfluss auf die Lebensfunktionen der Zellen hat. Vermutlich ist dies auf die Bereitstellung von Synthesebausteinen für die Nukleotidsynthese und die Produktion von NADPH/H<sup>+</sup> als Reduktionsmolekül für das Glutathionsystem zurückzuführen. Eine genauere Aussage lässt erst der Vergleich mit einer glukosefreien Umgebung zu, wo die Zellen in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Sauerstoff eine unterschiedliche Überlebensrate zeigen. Näheres hierzu wird im folgenden Abschnitt behandelt.

Ad 2.) Durch Naldini et al. konnte gezeigt werden, dass sich Hypoxie positiv auf die Expression von IL-2 auswirkt. Es wurde beobachtet, dass unter dem Einfluss einer 2%-igen Sauerstoffatmosphäre über 40 Stunden Inkubation eine erhöhte Expression von IL-2 und IL-4 durch PHA-stimulierte PBMCs erfolgte (66). Wang et al. konnten 2003 an Wistar Ratten mit hypoxischer pulmonaler Hypertension zeigen, dass die IL-6 Niveaus von Ratten unter Hypoxie zumindest auf der Ebene der mRNA gegenüber den normoxisch gehaltenen Vergleichstieren erhöht waren. Diese Gruppe stellt einen möglichen Zusammenhang der Hypoxiereaktion zur Familie der Januskinasen her, welche bei der Expressionssteigerung von IL-6 beteiligt sein könnten (67). Für IL-8 wurde durch Rydberg et al. eine hypoxiebedingte Expressionssteigerung durch Makrophagen festgestellt (68). Die Untersuchung von Plasmazytokinkonzentrationen von hypoxämischen C3H/HeN Mäusen zeigte eine Erhöhung des IL-10-, IL-6- und TNF- $\alpha$ -Spiegels unter Hypoxie. Interessanterweise waren hiervon nur männliche Mäuse betroffen. Die Gruppe um Knoferl vermutete eine höhere Toleranz weiblicher Mäuse dieses Stammes gegenüber Hypoxie (69). Die Verallgemeinerung der

Daten aus den Mausexperimenten ist jedoch nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. Man muss beachten, dass es sich bei den Versuchstieren um Individuen aus Inzuchtstämmen handelt, die durch ihre begrenzte Alleldiversität in ihren Zellfunktionen beeinträchtigt sein könnten.

Zur hypoxischen Expressionssteigerung von IL-1 $\beta$  ist zurzeit für Leukozyten wenig bekannt. Andere Zelltypen wie z.B. Mikrogliazellen reagieren den Untersuchungen von Kim et al. zu Folge mit einer Steigerung der Caspase-1 Aktivität über die Induktion von Caspase-11. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von IL-1 $\beta$  (70). Mikrogliazellen sind entwicklungsgeschichtlich mit den Makrophagen der Peripherie vergleichbar. Es könnte also sein, dass zumindest Makrophagen als Vertreter des peripheren Immunsystems ein ähnliches Verhaltensmuster aufweisen. Um die Expression von IL-1 $\beta$  durch T-Zellen beweisend zu klären, wäre es in Folgeexperimenten notwendig, eine intrazelluläre Färbung der CD4<sup>+</sup>-Zellen auf IL-1 $\beta$  durchzuführen und die Produktion im FACS nachzuweisen.

Betrachtet man den Einfluss der Hypoxie auf die Expression von MCAF, so ist die Signifikanz dieser Erhöhung zwar gegeben, jedoch ist das Ausmaß der Expressionssteigerung eher unbedeutend. In der Literatur gibt es zu diesem Faktor die übereinstimmende Meinung, dass Hypoxie einen suppressiven Effekt auf seine Expression ausübt. Allerdings sind bisher nur Fibroblasten und Makrophagen untersucht worden (71, 72). Für CD4<sup>+</sup>-Zellen existieren bislang keine Daten zu diesem Zytokin. Mit Ausnahme des Faktors MCAF unterstehen die untersuchten Zytokine einem Hypoxieeinfluss. Es handelt sich somit um eine universelle Erscheinung. Einen Erklärungsansatz für dieses Phänomen liefert möglicherweise der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$ . Daher wurden mit Hilfe einer Analyse der Promotorregionen der Zytokingene potenzielle Bindungsstellen für das Heterodimer aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  oder ein anderes Heterodimer aus HIF-1 $\beta$  mit beispielsweise HIF-2 $\alpha$  identifiziert. Eine Datenbankrecherche der 3kB-Promotorregionen aller dieser Zytokingene ergab für IL-1 $\beta$  eine Bindungsstelle für das HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  Heterodimer. Für IL-2 ergaben sich vier, für IL-6 eine, für das HIF-1 $\alpha$ - / HIF-1 $\beta$ -Heterodimer eine und eine weitere für ein anderes HIF-1 $\beta$ -Heterodimer, für IL-8 ergab sich eine mögliche Bindungsstelle für ein HIF-1 $\beta$ -Heterodimer, für IL-10 zeigten sich drei mögliche Bindungsstellen für ein HIF-1 $\beta$ -Heterodimer und eine Bindungsstelle für das HIF-1 $\alpha$ - / HIF-1 $\beta$ -Heterodimer. Für TNF- $\alpha$  ergab sich eine mögliche Bindungsstelle für ein HIF-1 $\beta$ -Heterodimer. In der Promotorregion des Gens für MCAF fanden sich keine

Bindungsstellen für HIF.

Die Ergebnisse der Datenbankanalyse weisen auf eine mögliche Beeinflussung der Gentranskription dieser Zytokingene durch HIF hin, sind jedoch nicht beweisend. Nicht jede mögliche Bindungsstelle in der Gendatenbank wird auch *in vivo* verwendet. Deshalb ist es in zukünftigen Experimenten notwendig, nach Beweisen für einen Zusammenhang zwischen HIF und der Transkription der behandelten Zytokine zu suchen. Hierzu bietet sich das folgende von Jeong et al. beschriebene Experiment an. Von dieser Gruppe wurden Mastzellen der Linie HMC-1 unter dem Einfluss von Desferrioxamin, einem Eisenchelator, unter Eisenmangel gesetzt. Dieser Mangel an Eisen verhindert den Abbau von HIF-1 $\alpha$  über die Hemmung der Prolylhydroxylasen und es kommt folglich zu einer intrazellulären Konzentrationserhöhung von HIF-1 $\alpha$ . Diese HIF-1 $\alpha$ -Erhöhung führte nun in der untersuchten Zelllinie zu einer vermehrten Produktion von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , welche sich durch die Zugabe von Eisen oder eines Hemmstoffes für NF $\kappa$ B unterdrücken ließ (73). Die Aussage von Jeong et al. zu TNF- $\alpha$  ist konträr zu den Beobachtungen der eigenen Experimente. Dies ist möglicherweise auf den verwendeten Zelltyp zurückzuführen. Für die anderen Zytokine existieren bisher keine direkt beweisenden Versuche, die einen funktionellen Zusammenhang rechtfertigen würden. Dies bedeutet, dass hier ein Ansatzpunkt für weitergehende Experimente gegeben ist, um die Verknüpfung zwischen HIF und IL-10, IL-1 $\beta$  oder MCAF zu beweisen. Als Startpunkt für ein solches Vorgehen bietet sich eine Chromatin-Immunpräzipitation an. Hierbei werden gegen das HIF-1 $\alpha$ -/ HIF-1 $\beta$ -Dimer gerichtete Antikörper dazu verwendet, das Heterodimer mit der gebundenen DNA aus dem vorher durch Sonifizierung fragmentierten Erbgut zu isolieren. Im Anschluss daran wird das Heterodimer von der DNA getrennt. Man kann nun mit geeigneten Primern und einer PCR gezielt aus dem Fragmentgemisch das vermutete Gensegment amplifizieren. Ergibt sich ein Produkt gegenüber einer Negativkontrolle, welche mit einem Antikörper gegen ein HIF fremdes Epitop gewonnen wurde, ist dies ein Beweis für die Bindung von HIF an die HIF Bindungsstelle des identifizierten Gens. Die Bindung von HIF muss jedoch nicht direkt an einer HIF Bindungsstelle sein. Sie kann auch über eine Bindung an andere Transkriptionsfaktoren wie Jab-1 oder AP-1 erfolgen. Diese Interaktionsmöglichkeit mit anderen Transkriptionsfaktoren macht es unmöglich vorherzusagen, an welchen Transkriptionssteigerungen HIF indirekt beteiligt ist. Sichere Interaktionen lassen sich demnach nicht aus Datenbankrecherchen sondern nur experimentell ermitteln. Die Betrachtung der verstärkten Zytokinexpression in Folge der Wirkung von HIF-1 $\alpha$  stellt nur

eine mögliche Methode zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen HIF und den Zytokinen dar. Es gibt auch die Möglichkeit, dass Zytokine ihrerseits die Wirkung von HIF beeinflussen. Diese Art der Beeinflussung von HIF-1 $\alpha$  ist durch einen Versuch von Jung et al. demonstriert worden. Die Gruppe konnte zeigen, dass die HIF-1-Signalkaskade durch die Gabe von IL-1 $\beta$  in A549-Zellen (Lungenepithelkarzinomzelllinie) insofern beeinflusst wurde, als dass die untersuchten Zellen mehr VEGF produzierten. Bei VEGF handelt es sich um ein Protein, welches, wie andere Forscher gezeigt haben, durch die Wirkung von HIF-1 $\alpha$  vermehrt exprimiert wird. Der Wirkmechanismus von IL-1 $\beta$  auf HIF ist durch Jung et al. als eine Hemmung der Degradation dieses Transkriptionsfaktors beschrieben worden. Da IL-1 $\beta$  auch die Transkription von COX-2 verstärkte und die Gruppe zeigen konnte, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> als Produkt dieses Enzyms die HIF-1 $\alpha$  Wirkung dosisabhängig steigerte, sahen sie hierin einen weiteren Beweis für die positive Wirkung von IL-1 $\beta$  auf HIF-1 $\alpha$  (74). Interessanterweise stellte die Gruppe mit ihrer Arbeit einen Zusammenhang zwischen einem proinflammatorischen Zytokin und den pathologischen Mechanismen dar, welche zur Tumorgenese und zur Versorgung von Tumorzellen mit Nährstoffen durch vermehrte Angiogenese beitragen.

In Hep-G2-Zellen konnte durch Stiehl et al. eine vermehrte DNA-Bindung des HIF-Heterodimers in Folge einer IL-1 $\beta$  und Insulinwirkung gezeigt werden. Diese Bindung konnte durch Blockierung der PI3K Signalkaskade unterdrückt werden. Hier konnte die HIF-induzierte Expression von VEGF und EPO selbst unter Normoxie beobachtet werden (75).

Aus diesen Betrachtungen ergibt sich folgende Hypothese. Wenn, wie in den Versuchen gezeigt, die Expression von IL-1 $\beta$  durch Hypoxie in CD4<sup>+</sup>-Zellen gesteigert werden kann und IL-1 $\beta$  seinerseits einen verstärkenden Einfluss auf die Wirkung von HIF hat, und wenn HIF wiederum die Expression von IL-1 $\beta$  verstärkt, was für CD4<sup>+</sup>-Zellen noch zu beweisen wäre, dann ergibt sich dadurch ein positiver, sich selbst verstärkender Zyklus, der die Inflammation vorantreibt.

Ein Hinweis auf das Zutreffen dieser Hypothese kann der Versuch von Williams et al. sein. Diese Gruppe untersuchte die Wirkung von IL-1-Antagonisten auf das Krankheitsbild der kollageninduzierten Arthritis bei Mäusen. Sie zeigten, dass die Gabe von Anti-IL-1 den Ausbruch der Erkrankung verzögern konnte. Sie stellten außerdem einen Zusammenhang zwischen der IL-1 $\beta$ -Konzentration und der Produktion von TNF- $\alpha$  her. Beide Zytokine schienen sich gegenseitig in ihrer Expression zu verstärken. Als wirksamsten therapeutischen

Schritt zur kompletten Unterdrückung der IL-1 Expression im Gelenk fanden die Forscher eine Kombination aus einer anti-TNF- $\alpha$ - und einer anti-CD4<sup>+</sup>-Therapie (76). Dies beweist, dass die IL-1 Expression durch CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und durch die TNF- $\alpha$ -Konzentration beeinflusst wird. Klinische Versuche mit IL-1 Rezeptorantagonisten haben bisher eine Verbesserung des Krankheitsbildes gezeigt. Hierbei ist die Multicenterstudie von Bresnihan et al. zu nennen. Es konnte in einem Zeitraum von 24 Wochen unter Therapie mit einem IL-1-Rezeptorantagonisten versus Placebo an über 400 Patienten mit RA eine Verbesserung des Krankheitsbildes in 44% der Fälle gezeigt werden (77). Sollte sich die aufgestellte Hypothese über die Selbstverstärkung von IL-1 $\beta$  unter Hypoxie bestätigen, so bietet eine Behandlung, die auf die Unterdrückung dieses Effektes abzielt eine Möglichkeit, das Voranschreiten der Erkrankung zu verhindern. Als Beispiel einer solchen Therapie ist hier die Behandlung mit IL-1-Rezeptoragonisten zu nennen.

Nach der Diskussion über die Auswirkungen von Hypoxie auf die Zellen unter Verfügbarkeit von Glukose stellt sich nun die Frage, wie die Zellen auf einen Mangel dieses Moleküls reagieren. Diese soll in den folgenden zwei Abschnitten diskutiert werden. Zuerst wird die Situation unter freier Sauerstoffverfügbarkeit demonstriert und ausgewertet. Dem soll sich das Verhalten der Zellen unter Hypoxie anschließen.

### **4.1.3 Auswirkungen von Glukosemangel unter Normoxie**

Die Betrachtungen zur Situation unter Normoxie bei Glukosemangel bieten sich als Kontrollparameter für den Zustand unter Hypoxie und Glukosemangel an, der in gewissen pathologischen Situationen möglich ist. Es soll nun erläutert werden, wie sich der Glukosemangel auf die Normoxiesituation auswirkt.

Erwartungsgemäß ist HIF-1 $\alpha$  unter Normoxie auch bei Glukosemangel nicht nachweisbar. Die Zellen zeigen eine sehr geringe Überlebensrate von lediglich  $30 \pm 22,6$  % (n=8) und unterscheiden sich damit signifikant von der glukosereichen Situation. Dies ist ein Beweis der Protektionswirkung von Glukose auf die Zellfunktionen, wie im vorherigen Abschnitt erläutert. Betrachtet man die Entwicklung der ATP-Niveaus unter Normoxie bei Glukosemangel über den Zeitraum des experimentellen Ablaufes, so kann man ein signifikantes, graduelles Absinken des ATP-Vorrats beobachten. Da die ATP-Messwerte auf die Zellzahl normiert sind, ist dieses Absinken durch die hohe Mortalität und die daraus

resultierende Zellzahlreduktion nicht zu erklären. Vielmehr stellt sich hier eine Situation dar, in welcher in der einzelnen Zelle das ATP-Niveau absinkt. Bei der Interpretation dieser Daten muss berücksichtigt werden, dass man von der ATP-Menge nicht automatisch auf die Synthese oder den Verbrauch schließen kann. Das ATP-Niveau ist das Netto-Resultat, das sich aus Produktion und Verbrauch ergibt. Ein Absinken kann daher aus einer verminderten Produktion und / oder einem erhöhten Verbrauch resultieren. Im nächsten Abschnitt (4.1.4) bei der Betrachtung der Hypoxie wird noch einmal genauer auf dieses Thema eingegangen. Auf die Frage, wie sich der Glukoseentzug auf das Zytokinprofil auswirkt, geben die **Abbildungen 17a und 17b** Antwort. Es ergibt sich folgendes Bild. Während, wie unter glukosehaltigen Bedingungen auch, TNF- $\alpha$  und IL-2 hochgradig exprimiert sind, zeigen sich IL-8 und IL-6 als mittel- und IL-10, MCAF und IL-1 $\beta$  als geringgradig exprimiert (**Abbildung 17a**). Betrachtet man in **Abbildung 17b** den Einfluss der Glukose auf die Expression der Zytokine, so fällt auf, dass IL-10 als stark reguliertes Protein auftritt, gefolgt von IL-2 und TNF- $\alpha$ . Man muss klären, ob dieser Einfluss von Glukose auch durch andere Forscher beobachtet werden konnte und ob es ein Erklärungsmodell für diese Beobachtung gibt. Hier lassen sich die Messungen der Gruppe um Jeschke als Hinweis auf eine Existenz dieser Beobachtungen *in vivo* anführen. Jeschke et al. untersuchten, wie die Gabe von Insulin das Serumzytokinprofil verändert. Man hatte beobachtet, dass Patienten mit septischem Schock unter Insulingabe ein besseres Überleben aufzeigten. Die Gruppe beobachtete bei mit Endotoxin behandelten Ratten einen insulinbedingten Anstieg der Zytokine IL-4, IL-2, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$  und IL-6. Da man nach Insulingabe jedoch keine signifikante Änderung des Plasmaglukosespiegels feststellen konnte, schrieb die Gruppe dem Insulin eine spezifische Beeinflussung der Zytokintranskription zu und schloss eine Wirkung über den Glukosestoffwechsel aus (78). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorliegenden Zytokinmessungen an CD4<sup>+</sup>-Zellen lassen jedoch auch eine andere Theorie zu. Insulin wirkt über die Beeinflussung von GLUT-4 Transportern auf die Glukoseaufnahme durch die Zellen. Nimmt man an, dass dieser Mechanismus auch für CD4<sup>+</sup>-Zellen gilt, ermöglicht die Gabe von Insulin den Zellen eine bessere intrazelluläre Verfügbarkeit von Glukose. Damit ist nicht auszuschließen, dass neben einer spezifischen Wirkung von Insulin auf die Zytokinsynthese eine unspezifische über die Verbesserung der Glukoseverfügbarkeit besteht.

Das Enzym Glukose-6-phosphatdehydrogenase dient dem Hexosemonophosphatweg als Eingangsenzym. Liese et al. wollten mit ihrem Versuch die Frage beantworten, warum Patienten mit einem Mangel des Enzyms eine stärkere inflammatorische Antwort auf Traumen zeigten als Traumapatienten mit intaktem Enzym. Sie verglichen unter anderem die IL-10-Produktion beider Gruppen durch PMA-Stimulation der Monozyten *in vitro* und fanden ein signifikant niedrigeres IL-10-Niveau bei Patienten mit dem Enzymdefekt. Dieses war auf 10% abgesunken. Daraus schlossen sie auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Enzymdefekt und der starken Immunantwort durch einen niedrigen IL-10-Spiegel (79). Mit diesem Versuch bewiesen Liese et al. jedoch auch einen relevanten Einfluss des Hexosemonophosphatweges mit der Glukose-6-phosphatdehydrogenase als wichtigem Enzym auf die Produktion von IL-10. Da der Enzymdefekt genetisch bedingt ist, liegt er in allen Zellen vor und sollte sich demnach auch in  $CD4^+$ -Zellen dieser Individuen zeigen. Eine andere Gruppe um Kuga konnte zeigen, dass IL-10 in humanen Monozyten die Expression von NADPH-Oxidase, einem Enzym, welches für die Superoxidanion-Synthese verantwortlich ist, senkt und sich somit negativ auf den respiratorischen Burst auswirkt (80).

Man kann zusammenfassen, dass IL-10 (a) in Anwesenheit von Glukose verstärkt exprimiert wird, (b) für diese Expressionssteigerung eine funktionstüchtige G-6-PDH benötigt und (c) die Generierung von Sauerstoffradikalen durch Monozyten hemmt. Hieraus resultiert eine weitere mögliche Erklärung für die hohe Mortalität der  $CD4^+$ -Zellen unter Normoxie bei Glukosemangel. Da Glukose die IL-10 Expression verstärkt, ergibt sich durch den oben beschriebenen Effekt eine Senkung der Superoxidanionen-Konzentration in der Zelle. Fehlt Glukose, sind die Zellen gezwungen ihre Energie aus der oxidativen Phosphorylierung zu gewinnen. Hierbei produzieren sie vermehrt ROS, also auch Superoxid-Anionen, welche die Membran schädigen. Wird in Folge des Glukosemangels weniger IL-10 gebildet, kann der membranschädigenden Wirkung der Radikale nichts entgegengesetzt werden und die Zellen sterben ab.

Es bietet sich in Folgeexperimenten an, diesem Effekt nachzugehen. Durch die Zugabe von rekombinantem IL-10 zu den unter Glukosemangel inkubierten  $CD4^+$ -Zellen könnte man den Einfluss dieses Zytokins auf das Zellüberleben charakterisieren. Superoxiddismutase-1 (SOD) dient als ein wichtiges Enzym im Radikalstoffwechsel. Es konnte beobachtet werden, dass unter den Bedingungen des Glukose- und Sauerstoffmangels die Gentranskription dieses Enzyms verstärkt wurde. Nähere Erläuterungen hierzu sind im **Abschnitt 4.2.2** zu finden. Die Situation unter Normoxie und Glukosemangel ist unphysiologisch, da ein Mangel an

Glukose nur in Extremsituationen auftritt. Anders verhält es sich jedoch, wenn zum Glukosemangel ein Sauerstoffmangel hinzukommt. Dieser Umstand soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

### 4.1.4 Verhalten bei Glukosemangel und Hypoxie

Ein Zustand, bei dem Glukose fehlt und Sauerstoff begrenzt oder nicht verfügbar ist, findet sich in Gewebegebieten mit chronischer Ischämie. Hierzu zählt auch das Pannusgewebe bei RA, in welchem bedingt durch die Gelenkschwellung ein relativer Mangel an Glukose und Sauerstoff besteht. Es stellt sich die Frage, wie sich CD4<sup>+</sup>-Zellen unter diesen Bedingungen verhalten.

Unter den genannten Umständen lässt sich in Folge der Hypoxie HIF-1 $\alpha$  nachweisen. Die Zellen zeigten eine ähnliche Überlebensrate von 73 %  $\pm$  11 % wie bei freier Glukoseverfügbarkeit. Dies beweist abermals die schädigende Wirkung von Sauerstoff auf das Zellüberleben. Ein anderer Grund für diese hohe Überlebensrate könnte in der Anwesenheit von HIF-1 $\alpha$  liegen. Walmsley et al. konnten jüngst zeigen, dass die Induktion von HIF-1 $\alpha$  in peripheren humanen neutrophilen Zellen durch Eisenchelatoren oder Hypoxie zu einer Unterdrückung der Apoptose führte. An myeloiden Zellen eines HIF-1 $\alpha$  konditionellen Knock-out-Mausmodells zeigte sich eine hohe Apoptoserate unter Hypoxie. Durch weitere Untersuchungen führten sie diesen Effekt auf die HIF-1 $\alpha$  abhängige Aktivität von NF $\kappa$ B zurück (81). Den gleichen anti-apoptotischen Effekt könnte die Anwesenheit von HIF-1 $\alpha$  bei CD4<sup>+</sup>-Zellen auslösen und somit das gute Überleben im Experiment erklären. Vergleicht man die Atmungskurve unter Glukosemangel mit der bei Glukoseverfügbarkeit aus **Abbildung 2**, so sieht man nicht mehr eine konstante Atmungsrate. Die Zellen weisen besonders im Bereich zwischen 80 und 150 Minuten eine stärkere Atmung auf, um dann schneller in die Anoxiephase überzugehen. Aus **Abbildung 3a** lässt sich entnehmen, dass die Unterschiede in der Atmungsrate sich besonders bei einer Sauerstoffsättigung zwischen 10 % und 40 % bemerkbar machten. Aus einer Zusammenfassung der beiden **Abbildungen (2 und 3a)** und über die Berechnung der Clearance lässt sich erklären, wie die Zellen dem verstärkten Energiemangel begegnen. Ein Vergleich der Clearanceraten in **Abbildung 3b** zwischen den Bedingungen mit Glukose und ohne Glukose veranschaulicht die Steigerung der Extraktionsleistung der Zellen unter Glukosemangel ab einer Sättigung von 40 % und darunter. In dieser Situation gibt es für die Zellen aus Mangel an Glukose nur die gesteigerte Extraktion von Sauerstoff aus dem Medium zur verstärkten Energiegewinnung über die



OXPHOS, während die Zellen im glukosehaltigen Medium die Glykolyse als zusätzlichen Weg zur Energiegewinnung verwenden. Das Verhalten bei Glukosemangel zeigt, dass die Zellen grundsätzlich in der Lage sind, diese Leistungssteigerung zu erbringen.

Das ATP-Niveau der Zellen präsentiert sich unter Hypoxie ähnlich wie unter Normoxie nach sechs Stunden Inkubation ( $0,19 \pm 0,18$  nmol ATP pro  $10^7$  Zellen). Somit scheint die Verfügbarkeit von Sauerstoff auf die Bilanz zwischen ATP-Produktion und ATP-Verbrauch weniger Einfluss zu haben als die Verfügbarkeit von Glukose. Glukose steigert den ATP-Gehalt der Zellen. Diese Steigerung des ATP-Niveaus kann hypothetisch Konsequenzen für die Reaktion auf Glukokortikoidgabe haben. Es ist bekannt, dass hohe ATP-Niveaus zu einer besseren inhibitorischen Wirkung von Glukokortikoiden auf die Immunantwort führen (82). Hierbei ist die höhere Apoptoserate von mit Dexamethason behandelten Thymozyten zu erwähnen. Lässt sich diese Beobachtung verallgemeinern, so ergibt sich die Frage, ob in Geweben mit chronischer Ischämie eine effektive Wirkung von Glukokortikoiden möglich ist. Ist möglicherweise, durch den niedrigen ATP-Spiegel bedingt, eine höhere Dosis an Glukokortikoiden zur Einleitung einer Apoptose der autoreaktiven Immunzellen notwendig?

Widmet man sich dem Zytokinprofil unter Hypoxie und Glukosemangel, so erkennt man die schon bei den anderen Zuständen beobachtete Hierarchie. Hierbei sind IL-2 und TNF- $\alpha$  hoch exprimiert, während sich IL-8, IL-6 und IL-10 im Mittelfeld befinden und die Expression von IL-1 $\beta$  und MCAF niedrig ist. Betrachtet man die Auswirkung von Hypoxie auf die Zytokinexpression, wie sie in **Abbildung 15** dargestellt ist, dann fällt auf, dass IL-1 $\beta$  und IL-10 stark und IL-8 und IL-2 mäßig beeinflusst sind. TNF- $\alpha$  präsentiert sich im Gegensatz zur Situation mit Glukose als positiv durch Hypoxie reguliert. Man kann also für TNF- $\alpha$  eine Situation beobachten, bei der der Einfluss von Glukose die Expressionsverhältnisse ins Gegenteil verkehrt. Es findet sich unter Normoxie wie unter Hypoxie eine starke Beeinflussung der IL-10-Produktion durch Glukose. Dies rechtfertigt eine weitergehende Untersuchung von IL-10 in zukünftigen Experimenten. Man kann aus den vorliegenden Daten schließen, dass die gemessenen Zytokine durch die Präsenz von Glukose vermehrt exprimiert werden. Dies ist wahrscheinlich durch die anabole Wirkung von Glukose über den Pentosephosphatweg zu erklären. Es könnten jedoch auch sensitive Bindungsstellen in der Promotorregion dieser Zytokingene existieren, die durch die Wirkung von Glukose oder anderer von ihr abhängiger Stoffwechselprodukte aktiviert

werden. Hypoxie hat auf die Expressionssteigerung in den meisten Fällen einen verstärkenden Effekt. Somit ist die Unterhaltung des proinflammatorischen Status der CD4<sup>+</sup>-Zellen von den beiden Faktoren Glukoseverfügbarkeit und Hypoxie abhängig.

### 4.1.5 Ausblick

Alle Beobachtungen in dieser Arbeit basieren auf Daten von Normalspendern. Es stellt sich nun die Frage, ob sich die CD4<sup>+</sup>-Zellen bei Krankheitsbildern wie Rheumatoider Arthritis anders verhalten. Es wurde bei den hier vorgestellten Experimenten ein großer Einfluss von Hypoxie auf die Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IL-10 gezeigt. Daher ergibt sich die Frage, ob dies unter pathologischen Bedingungen auch der Fall ist. Die erwähnten Zytokine spielen besonders bei RA-Patienten, aber auch im folgenden Mausmodell, eine wichtige Rolle.

Das SKG Mausmodell zur Simulation von einem Krankheitsbild bei Mäusen ähnlich dem humanen Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis beruht auf einer Mutation im ZAP-70 Gen, welches für die positive und negative Selektion von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Thymus während ihrer Reifung verantwortlich ist. Durch Verlust dieser Selektionsfähigkeit werden zufällig entstandene autoreaktive T-Lymphozyten nicht mehr aussortiert und persistieren im Organismus. Der Phänotyp dieser Mäuse zeichnet sich durch typische Zeichen der Rheumatoiden Arthritis aus. Hierzu zählen Schwellungen der kleinen und später der großen Gelenke mit histologisch eindeutiger Synovitis, Pannusbildung und Knorpel-Knocheninvasion durch Immunzellen mit nachfolgender Zerstörung, hohen Titern von Rheumafaktoren IgM und IgG mit Spezifität für Kollagen II (IgG) und extraartikulären rheumaknotenähnlichen Strukturen. Als Begleitphänomen treten interstitielle Pneumonitiden und Vaskulitiden auf.

Ein Transfer der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten dieses Mäusestammes auf SKG-Mäuse mit BALB/c Background, BALB/c Mäuse ohne eigene funktionelle T-Lymphozyten oder SCID Mäuse ohne eigene T- und B-Lymphozyten, induziert bei diesen die oben beschriebenen Symptome. Es kann davon ausgegangen werden, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen als Hauptmediatoren dieses Krankheitsbildes wirken. Sakaguchi et al. zeigten unter anderem, dass in der Synovialflüssigkeit von 32 Wochen alten SKG Mäusen mit schwerwiegenden Gelenkschwellungen hohe Mengen an IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  vorlagen, während sich im Serum von 20% der Mäuse nur IL-6 in signifikanten Mengen nachweisen ließ. Immunhistochemisch wurden zwei Zellpopulationen entdeckt, wovon erstere IL-1 $\beta$  und TNF-

$\alpha$  exprimierte und in der der Gelenkhöhle zugewandten Zellschicht der Synovialmembran zu finden war. Die andere bestand aus IL-6 produzierenden Zellen, welche unter dieser Schicht diffus verteilt waren. Um nun den Einfluss der Zytokine IL-1 $\alpha$  und  $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  zu untersuchen, wurden IL6<sup>-/-</sup>, IL1 $\alpha/\beta$ <sup>-/-</sup> und TNF<sup>-/-</sup> und IL10<sup>-/-</sup>-Mäuse gezüchtet. Bei den IL-6 defizienten Mäusen zeigten sich keinerlei Symptome einer Arthritis oder interstitiellen Pneumonie, was diesem Faktor einen sehr wichtigen Stellenwert in der Unterhaltung dieses Krankheitsbildes einräumt. Bei den IL1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich eine bei weitem mildere Verlaufsform der Erkrankung mit nur 60% betroffenen Tieren und einer durchschnittlichen Schwellung von nur zwei Gelenken. Bei TNF- $\alpha$  defizienten Mäusen zeigte sich eine Inzidenz von nur 20% und eine ebenfalls mildere Verlaufsform der Arthritis. IL-10 defiziente Mäuse waren allgemein schwerer betroffen als die in ihrer Zytokinexpression unveränderte Vergleichsgruppe. Dies belegt einen anti-inflammatorischen Effekt durch IL-10 bei dieser Erkrankung. Alle heterozygoten Tiere zeigten mittlere Symptomstärke, so dass auf eine Abhängigkeit der Gendosis auf diese Effekte geschlossen werden kann. Auch die Rolle der Rheumafaktoren wurde von Sakaguchi et al. untersucht. Man stellte bei den zytokindefizienten Mäusen wie bei den Vergleichstieren vergleichbare Titer von IgM-RF fest, während die Präsenz von IgG-RF für Kollagen Typ II nur bei den Tieren mit Synovitis auftrat. Somit scheint IgG-RF für Kollagen II entweder als Ursache oder als Folge der Synovitis aufzutreten (83).

An diesem Modell lässt sich die Relevanz der untersuchten Zytokine für das Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis belegen. Inwieweit dieses Modell auf den Menschen übertragbar ist, wird sich in Experimenten und klinischen Studien zeigen.

In Fortsetzung der Arbeiten zu dieser Dissertation ist eine Versuchsreihe mit T-Lymphozyten von RA-Patienten geplant. Diesen neuen Untersuchungen könnten ein abweichendes Verhalten der CD4<sup>+</sup>-Zellen aufdecken. Hieraus ergäben sich Ansatzpunkte welchen Stoffwechselweg man beeinflussen könnte, um den inflammatorischen Circulus vitiosus, der das Wesen der RA ausmacht, zu durchbrechen. Ansätze hierzu sind mit der Therapie mit Anti-TNF- $\alpha$  und den IL-1 $\beta$ -Rezeptorantagonisten schon vorhanden. Möglicherweise ergeben sich durch weitere Forschungen in dieser Richtung spezifischere und ökonomischere Therapiemöglichkeiten.

## 4.2 Regulation der Expression von Zielgenen

Zur Untersuchung der Wirkung von Hypoxie- und Glukosemangel auf die Genexpression von ausgewählten Zielgenen wurde sich in dieser Arbeit bewusst auf jeweils einen Vertreter zweier bedeutsamer Stoffwechselwege festgelegt, weil diese in den entsprechenden Stoffwechselwegen von entscheidender Bedeutung sind. Zum einen ist dies die Superoxiddismutase-1 als Vertreter des Radikalstoffwechsels der Lymphozyten und zum anderen die Hexokinase als Schlüsselenzym der Glykolyse, wobei hier alle fünf existierenden Transkriptvarianten für die mRNA dieses Enzyms zusammengefasst wurden. Mit dieser Untersuchung sollte geklärt werden, wie sich die Expression dieser wichtigen Schlüsselenzyme unter den verschiedenen Bedingungen verhält. Hexokinase ist ein stark reguliertes Schlüsselenzym der Glykolyse. Seine Expression ist möglicherweise durch die Wirkung des Transkriptionsfaktors HIF-1 beeinflusst. Die Beeinflussung der Expression von SOD1 als ein wichtiges Enzym des Radikalstoffwechsels sollte Aufschluss über mögliche Zellschädigungen geben, die das Zellüberleben und die Zellfunktion beeinflussen.

### 4.2.1 Hexokinase (Typ 1)

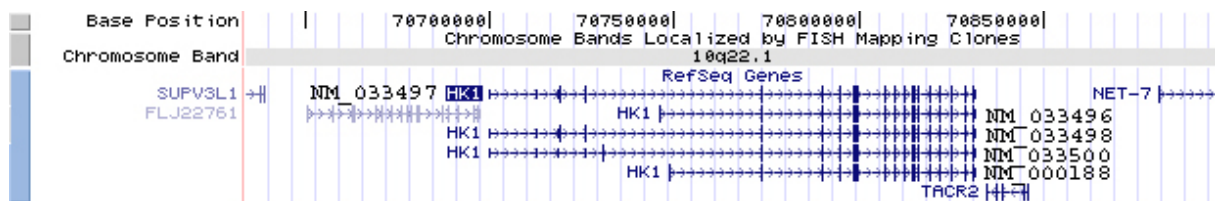
In **Abbildung 18** erkennt man deutlich die Erhöhung der Transkription des Hexokinasegens unter Hypoxie, jedoch nur, wenn Glukose im Medium vorhanden ist. Diese Erhöhung (Faktor 3.2 gegenüber glukosefreier Hypoxie bzw. Faktor 4 gegenüber Ausgangsexpression) ist auf die gesteigerte Anforderung an die Glykolyse zur Energiebereitstellung zurückzuführen. Die Fähigkeit dieser Expressionssteigerung lässt den Schluss zu, dass die Transkription des Hexokinasegens durch den Glukosegehalt im Medium reguliert wird. Das alleinige Vorhandensein von Glukose reicht jedoch nicht für die Transkriptionssteigerung aus, wie man unter Normoxiebedingungen beobachten kann. Zusätzlich muss, um Energie aus dem anaeroben Glukosestoffwechsel zu gewinnen, die Bedingung der Hypoxie erfüllt sein. Nur wenn die Notwendigkeit (Hypoxie) und die Möglichkeit (Glukoseanwesenheit) zur gesteigerten ATP-Synthese durch die Glykolyse vorhanden sind, dann wird die Transkription des Hexokinasegens gesteigert. Also muss es für diese Anpassungen auch einen Sensor- und einen Regulationsmechanismus geben.

Für die Regulation der Transkription unter Hypoxie käme das in **Abschnitt 1.3** beschriebene HIF-1 Protein in Frage. Eine Promotorstudie auf Basis der Genomatix Software ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)) der Transkriptionsvariante 1 des Hexokinasegens (NM\_00188), welche sich bis zu 3 Kilobasen vor den Transkriptionsstart erstreckt, ergibt 3 potentielle Bindungsstellen für HIF-1 $\beta$ -Heterodimere und eine Bindungsstelle für den HIF-1 $\alpha$ -/HIF-1 $\beta$ -

Komplex. Eine Bindung von HIF-1 in der Promotorregion des Hexokinasegens und somit ein Einfluss auf die Transkription dieses Gens ist laut Genanalyse möglich. Das Vorhandensein von HIF-1 Protein im Zellkern durch die beiden im Vorfeld erwähnten zur HIF-Stabilisierung möglichen Mechanismen (Hypoxie und / oder TNF- $\alpha$ -Stimulation) ist somit als möglicher Hypoxieregulator der Zelle anzusehen. Durch Yasuda et al. konnte für Leberzellkarzinomzellen gezeigt werden, dass eine erhöhte HIF-1 $\alpha$ -Konzentration in der Zelle für eine verstärkte Expression von Hexokinase II sorgt (84). Warum CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Lage sind nur bei Hypoxie und Anwesenheit von Glukose im Medium die Transkription von Hexokinase zu steigern, ist schwierig zu erklären. Möglicherweise ist hier auch eine Akkumulation von 5'-AMP (5'-Adenosin-Monophosphat) als Ursache für eine verstärkte Hexokinasetranskription zu sehen. 5'-AMP wirkt als Aktivator der 5'-AMP Kinase. Dieses Enzym ist in Muskelzellen dafür bekannt, die Expression von Hexokinase und GLUT-4 Transportern zu steigern. Somit würde ein Energiemangel, welcher sich durch den Anstieg von AMP auszeichnen würde, zu einer Aktivierung der Glykolyse und der Glukoseaufnahme führen (85). Wenn 5'AMP unter Hypoxie verstärkt anfällt, würde es nur in dieser Situation zu einem Anstieg der Transkription des Hexokinasegens kommen. Die folgende Promotoranalyse gibt nur einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Transkriptionsregulation des Hexokinasegens und HIF-1 Wirkung. Es bietet sich im Anschluss zur Verifikation eine Chromatin-Immunpräzipitation an. Der experimentelle Ablauf hierzu ist in **Abschnitt 4.1.2** beschrieben worden. Die Analyse der Promotorregionen der anderen, im Anschluss an **Abbildung 20** näher beschriebenen Transkriptionsvarianten von Hexokinase, ergibt, dass für einen möglichen Regulationsmechanismus durch Bindung von HIF-1 an Bindungsstellen im Promotorbereich nur noch die Variante 2 (NM\_033496) in Frage kommt. Im Bereich von 3kB vor dem Transkriptionsstart existieren noch zwei Bindungsstellen für das HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ -Heterodimere. Untersucht man die Promotorregion im Bereich um 3kB vor den Varianten 3, 4 und 5(NM\_033497; -498; -500) so findet sich weder eine Bindungsstelle für HIF1 $\beta$ -Heterodimere noch für HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ -Heterodimere. Dies lässt vermuten, dass diese Varianten von Hexokinase bei der Regulation unter Hypoxie durch HIF-1 keine Rolle spielen. Allerdings ist hier ein experimenteller Beweis nötig. Es ist zukünftig notwendig, nicht wie im Ansatz dieser Dissertation ein Primerpaar für die Gesamtheit aller Transkriptionsvarianten zu verwenden, sondern für jede einzelne ein spezifisches Primerpaar zu konstruieren, und die cDNA-Proben der vorliegenden Experimente nochmals auf die Expression der einzelnen

Transkriptvarianten zu untersuchen. Bestätigt sich dann die Hypothese, dass Variante 1 und 2 die vorherrschend exprimierten Transkriptionsprodukte unter Hypoxie darstellen, so stellt dies ein sehr energiesparendes und auf eine schnelle Reaktion ausgelegtes Konzept dar. Während nämlich bei Aktivierung der Transkription von Variante 1 nur 83kb in hnRNA transkribiert werden müssen, sind es bei Variante 2 schon 86kb und bei den Varianten 3 bis 5 knapp je 132 kB. Interessant ist auch, dass sich innerhalb der 3kB, um die Variante 2 länger ist als Variante 1, drei Bindungsstellen für HIF1 $\beta$ -Heterodimere und eine Bindungsstelle für das HIF-1 $\alpha$ -HIF-1 $\beta$ -Heterodimer befinden. Aus der vorausgegangenen Betrachtung lässt sich die Vermutung ableiten, dass HIF konzentrationsabhängig die Expression dieser beiden Transkriptvarianten reguliert.

In folgender Abbildung sind die Lokalisationen der einzelnen Transkriptionsvarianten auf Chromosom 10 dargestellt. Man kann den Längenunterschied zwischen ihnen erkennen.



**Abbildung 20** Darstellung der Transkriptionsvarianten für das Hexokinase 1 Gen auf Chromosom 10 (Variante 1 NM\_000188; Variante 2 NM\_033496; Variante 3 NM\_033497; Variante 4 NM\_033498; Variante 5 NM\_033500) und ihrer relativen Positionen zueinander (erstellt über UCSC-Genome)

Die fünf Varianten unterscheiden sich wie folgt. Das Produkt von Variante 1 kommt ubiquitär in allen Zelltypen vor und zeigt N-terminal eine Porinbindungsdomäne (PBD), worin es sich zu allen anderen Varianten unterscheidet. Diese Bindungsdomäne ermöglicht es dem Enzym, auf der Mitochondrienmembran zu binden. Ein Defekt dieser Variante führt zu nicht sphärozytischer hämolytischer Anämie. Während die anderen Formen aus Mangel an dieser Porinbindungsdomäne frei im Zytosol vorkommen, ist die Hexokinase 1 (Variante 1) mit der Mitochondrienmembran assoziiert.

Variante 2 ist vorwiegend in Zellen der erythroiden Reihe zu finden, wo sie besonders in der Entwicklung zu RBCs aus Progenitorzellen aktiv ist, während die Varianten 3 bis 5 viele testisspezifische N-terminale Bindungsdomänen aufweisen. Demzufolge ist die Zunahme an Länge der Transkriptionsvarianten mit einer verstärkten Gewebespezifität assoziiert (86, 87).

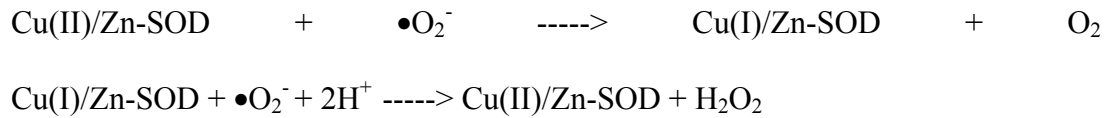
#### 4.2.2 Superoxiddismutase-1 (Cu/Zn)

Das Enzym Superoxiddismutase-1 spielt eine wichtige Rolle im Radikalstoffwechsel. Wie im Vorfeld schon beschrieben dient die Betrachtung dieses Enzyms dazu, die mögliche Reaktion der Zellen auf Unterschiede im Nährstoffangebot und im Energiestoffwechsel und der damit einhergehenden Änderung der Radikalentstehung einzuschätzen. Es gibt zwei Formen der SOD, die sich evolutionär getrennt voneinander entwickelt haben und sogenannte funktionelle Analoga bilden. Zum einen ist dies die Kupfer/Zink abhängige Form des Enzyms mit ihrer Genlokalisierung auf dem p-Arm des Chromosoms 21 (21p22.1), zum anderen ist es die Mangan abhängige Analogform, welche ihren Genlokus auf dem q-Arm von Chromosom 6 hat (6q25.2). Zusätzlich zu diesen beiden Formen ist noch eine dritte unter dem Namen SOD3 bekannt, welche durch den Genlokus auf dem p-Arm des Chromosoms 4 (4p15.3-15.1) kodiert wird. Während SOD1 im Zytoplasma vorkommt, findet man SOD2 mitochondrial und SOD3 extrazellulär. Die von allen drei Enzymtypen katalysierte Reaktion dient der Umwandlung von Superoxidradikalen in Wasserstoffperoxyd, wie in **Abschnitt 1.2** beschrieben. Mutationen im SOD1 Gen werden in Verbindung mit der Pathogenese von amyotropher Lateralsklerose bei 15-20% der betroffenen Personen gebracht. Ackerman et al. präsentierten in einem Fallbericht einen Jungen mit partieller Monosomie 21, welche den Genlokus für SOD1 einschloss. Dieser Patient zeigte eine nur 40%ige Aktivität der SOD1. Durch Hyperventilation mit 100% Sauerstoff während einer Narkosesituationen war er von oxidativen Lungenschäden schwerer betroffen als durch eine Ventilation mit 30%igem Sauerstoffanteil. Er zeigte eine Enzymaktivität der Cu/Zn-SOD von nur 45% im Vergleich zu disomen gleichaltrigen Kindern. Daraus schlossen die Forscher, dass durch Monosomie 21 betroffene Individuen anfälliger für Lungenschäden sind, die durch einen zu hohen Sauerstoffanteil verursacht sind. Ihr Umkehrschluss, dass trisome Patienten besser auf Hyperventilationsstress reagieren können, blieb jedoch nur theoretisch formuliert (88). Aus der Lokalisation auf Chromosom 21 und aus der nachgewiesenen gesteigerten Aktivität der SOD1 bei Trisomie 21 Patienten ließe sich hypothetisch ableiten, dass diese Individuen einen Vorteil in Bezug auf den Abbau von Superoxidradikalen haben, und somit einen besseren Schutz der Zellmembranen vor Lipidperoxidation gegenüber dem disomen Individuum zeigen. Erstaunlicherweise ist dies nicht der Fall. Die Gründe hierfür sind noch unklar, es existieren jedoch Hypothesen, inwieweit alternative Radikalstoffwechselwege zu diesen Schädigungen beitragen. Im Folgenden sind diese näher beschrieben:

1. Hypothese: Das Cu/Zn-SOD-Enzym existiert in zwei Zuständen, einem oxidierten (Cu(II)/Zn-SOD) und einem reduzierten Zustand (Cu(I)/Zn-SOD). Während der oxidierte

## Diskussion

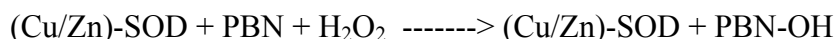
Zustand die Reaktion von Superoxidradikalen zu Sauerstoffmolekülen begünstigt, ist die zweite Form in der Förderung der Reaktion von Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxyd aktiv. Somit ergeben sich zwei, dem Oxidationsstatus der Zelle angepasste Reaktionswege für das Superoxidradikal:



Eine Verlagerung des SOD Zyklus könnte zu einer vermehrten Bildung von Wasserstoffperoxyd führen. Dies konnte experimentell gezeigt werden und dürfte besonders für trisome Patienten mit gesteigerter Enzymmenge zutreffen. Diese Verlagerung wirkt sich ihrerseits membranschädigend aus, wenn ein anderer Elektronendonator die Stelle des Superoxidradikals einnimmt und das Enzym in einem reduzierten Status (Cu(I)/Zn-SOD) hält (89).

Möglicherweise wäre auch eine erhöhte Protonenkonzentration in Folge der verstärkt ablaufenden Glykolyse unter Hypoxie für eine Verschiebung der Superoxiddismutasereaktivität in Richtung Wasserstoffperoxyd möglich. Somit wäre bei niedrigem pH die Reaktion von Superoxidradikal zu Wasserstoffperoxyd begünstigt.

2. Hypothese: Es gibt die Möglichkeit einer Reaktion von SOD mit Wasserstoffperoxyd und Anionenverbindungen unter Bildung eines hochreaktiven Hydroxylradikals. Nachgewiesen wurde diese Möglichkeit über die Spin-Trap Technik, bei welcher ein diamagnetisches Edukt durch Bindung an ein kurzlebiges Radikal in ein mittellebiges und damit gut nachweisbares Addukt überführt wird. In diesem Fall wurde als Spin-Trap-Molekül N-tert-butyl- $\alpha$ -phenyl-nitrone (PBN) verwendet. Es konnte folgende Reaktion nachgewiesen werden, welche eine Bildung von Hydroxylradikalen durch SOD zeigt (90):



Wird angenommen, dass bei Trisomie 21 mehr aktives Enzym vorherrscht, so könnte es in Folge dessen zu einem relativen Mangel an Superoxidradikalen kommen. Das entstehende Wasserstoffperoxyd würde bei einem Insult durch Hyperoxie nicht vollständig durch Katalasen in ungefährliches Wasser und Sauerstoff umgewandelt, sondern ein Teil würde



durch die Superoxiddismutase in Hydroxylradikale überführt werden. So ist dadurch das Paradoxon der mehr als ausreichenden Enzymmenge bei vermehrter Schädigung der Zellmembranen erklärt.

In den der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimenten zeigte sich, wie in **Abbildung 19** dargestellt, ein signifikanter Unterschied in der Transkriptionsstärke von SOD1 unter Hypoxie bei Glukosemangel gegenüber Hypoxie bei freier Glukoseverfügbarkeit. Unter Normoxieeinfluss ist kein signifikanter Unterschied in der Transkription zwischen den beiden Inkubationsmodalitäten ersichtlich. Man kann also feststellen, dass CD4<sup>+</sup>-Zellen unter dem Einfluss von Hypoxie nur in Abwesenheit von Glukose mit einer Transkriptionssteigerung für SOD1 reagieren. Demnach ergibt sich wieder die Frage nach einem Sensormechanismus sowohl für die Verfügbarkeit von Glukose als auch für die Sauerstoffversorgung der Zellen. Inwieweit der Status der Glukoseversorgung erfasst wird, lässt sich mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren nicht erklären. Eine Promotoranalyse des SOD1-Gens auf Bindungsstellen für HIF ergibt jedoch eine Bindungsstelle für den HIF-1 $\alpha$ -/HIF-1 $\beta$ -Komplex und fünf Bindungsstellen für HIF-1 $\beta$ -Heterodimere. Es kann also als eine Möglichkeit die Regulation dieses Gens durch HIF vermutet werden. Im Gegensatz zur Hexokinasetranskription ergibt sich im Hinblick auf die Verfügbarkeit von Glukose ein hemmender Effekt auf die Transkription der SOD1. Takamya et al. untersuchten die Auswirkungen von Glykosylierung auf die Aktivität von drei unterschiedlichen SOD1 Mutanten gegenüber Wildtypkontrollen. Sie stellten eine glykosylierungsbedingte Aktivitätssteigerung der Enzyme fest. Hierbei waren die mutierten Varianten stärker betroffen. Es zeigte sich eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Glykosylierungsgrades und der damit verbundenen Aktivitätssteigerung (91). Setzt man voraus, dass auch die Wildtypform des Enzyms durch Glykosylierung in seiner Aktivität gesteigert werden kann, so würde sich hieraus die geringe Transkriptionssteigerung für die SOD1 unter Glukoseeinfluss erklären lassen. Wenn das Enzym in der Lage ist mehr Superoxid-Anionen umzusetzen, d.h. durch eine Aktivitätssteigerung den erhöhten Bedarf an Enzymaktivität zu decken, so ist eine verstärkte Enzymexpression nicht notwendig. Ein anderer Erklärungsversuch für die hier beobachtete, weitgehend unbeeinflusste Transkription der SOD1 unter dem Einfluss von Glukose ergibt sich aus der oben beschriebenen Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes durch einen Überschuss von Protonen (niedriger pH) zu Gunsten der Produktion von Wasserstoffperoxyd. Wird diese

Reaktion durch den pH begünstigt und läuft die Umsetzung von Superoxidradikalen bei niedrigem pH schneller ab, so ist die Notwendigkeit einer Transkriptionssteigerung und einer de novo Synthese für das Enzym ebenfalls nicht mehr gegeben. Um diese Behauptungen zu beweisen, müsste untersucht werden, ob die Transkriptionsfaktoren von SOD1 durch eine Veränderung des pH Wertes direkt oder indirekt reguliert werden. Für das VHL-Protein, welches für die Degradation von HIF-1 $\alpha$  verantwortlich ist, ist eine Abhängigkeit vom intrazellulären pH beschrieben worden. Es zeigte sich, dass das VHL-Protein in azidotischer Umgebung in seiner Wirkung gehemmt wird (92). Somit wird HIF-1 $\alpha$  bei niedrigem pH nicht degradiert und kann die Expression seiner Zielgene verstärken, zu denen auch das SOD1-Gen gehören könnte.

### 4.3 Diskussion zur Korrelationsanalyse

Korrelationsanalysen dienen dem Zweck, mögliche Zusammenhänge zwischen verschiedenen Variablen einer Versuchsreihe zu erkennen. Dieses Verfahren wurde hier angewandt, um Verbindungen zwischen einzelnen Versuchsvariablen zu identifizieren, die Einfluss auf die Messergebnisse gehabt haben können. Hierzu zählen die Auswirkung der Probenreinheit auf die Zytokinproduktion und besonders die möglichen Interaktionen der gemessenen Zytokine untereinander. Die in den **Tabellen 3a, 3b, 4a und 4b** dargestellten Ergebnisse basieren auf einer Korrelationsanalyse nach Pearson, bei welcher der lineare Zusammenhang zweier Variablen untersucht wird. Alle dargestellten Ergebnisse sind signifikant ( $p < 0,05$ ). Bei manchen Aussagen ist der P-Wert geringer. Diese Analyse sollte die Fragen beantworten, ob die Verunreinigung mit CD4<sup>low</sup>-Zellen einen Einfluss auf die Expression bestimmter Zytokine hatte, und ob diese Zellpopulation möglicherweise die Produzenten des betreffenden Zytokins waren.

In **Tabelle 3a** zeigen sich positive Korrelationen zwischen TNF- $\alpha$  und IL-2 sowie zwischen TNF- $\alpha$  und IL-8 für Normoxie in glukosehaltigem Medium. Betrachtet man diese für die unter Normoxie gehaltenen Zellen, so stellt man einen Zusammenhang zwischen TNF- $\alpha$  und IL-2, sowie TNF- $\alpha$  und IL-8 fest. Dies ist wahrscheinlich durch eine dritte Variable zu erklären. Gemeinsam haben diese drei Zytokine, dass sie nur unter Stimulation sekretiert werden. Wahrscheinlich ist die in den Experimenten verwendete PMA- / Ionomycinstimulation für das Ansteigen der Expression aller drei Faktoren verantwortlich. Somit ist eine Aussage, welches Zytokin die Produktion eines der anderen beiden initiiert aus

der Datenlage nicht zu beantworten. Bekannt ist, dass TNF- $\alpha$  über die Aktivierung von NF $\kappa$ B in der Lage ist, die Expression von IL-8 in fibroblastenähnlichen Synoviozyten (FLS) zu verstärken (93). Demzufolge wäre nicht nur durch die reine Stimulation mit PMA/ Ionomycin sondern auch durch die induzierte TNF- $\alpha$ -Wirkung über NF $\kappa$ B die beobachtete positive Korrelation zwischen TNF  $\alpha$  und IL-8 zu erklären. In **Tabelle 3b** zeigt sich eine unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit bestehende Korrelation zwischen der Population der schwach positiven CD4-Zellen und der Zytokinexpression von IL-1 $\beta$ . Diese Zellpopulation zeichnet sich durch eine schwache Expression des CD4-Moleküls an der Zelloberfläche aus. Es lässt sich vermuten, dass diese Population in besonderem Maße an der IL-1 $\beta$  Produktion durch die Zellsuspension beteiligt ist. Eine weitere Charakterisierung dieser Subpopulation durch andere Marker würde sich in diesem Fall anbieten. Entscheidend hierbei wäre eine intrazelluläre Färbung mit einem fluorochrommarkierten Antikörper gegen IL-1 $\beta$  im FACS in Verbindung mit einer Simultanfärbung gegen das Oberflächenepitop CD4 sowie möglicher anderer Oberflächenmarker zur weiteren Charakterisierung dieser Population. In ähnlicher Weise muss der mögliche Zusammenhang zwischen dieser Population und der IL-8 Produktion unter Hypoxie aufgeklärt werden.

Betrachtet man die Korrelationen der Zytokine unter Hypoxie, so steht lediglich IL-8 in Verbindung mit dem Anteil an schwach CD4 positiven Zellen in der Zellsuspension. In dem IL-8 behandelnden Einleitungsteil (**Abschnitt 1.4.5**) wird an einer Stelle die Hypothese geäußert, dass CD4-positive T-Lymphozyten möglicherweise nicht die Quelle des Zytokins sind, sondern eine verunreinigende Population die Ursache für die IL-8 Expression darstellen könnte.

In dem Artikel von Smyth et al. wurden PBMC in vier Subpopulationen fraktioniert. Zum einen waren dies CD4-positive Zellen, welche IL-8 lediglich auf mRNA Ebene in messbarem Umfang produzierten, zum anderen wurden CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten gewonnen, die sich ähnlich verhielten. Als dritte Subpopulation wurde LGL (Large granular lymphocytes) genannt, welche in der Lage war, IL-8 auch auf Proteinebene zu exprimieren. Des Weiteren wurden Monozyten fraktioniert, welche als Prototypen der IL-8 Produzenten gelten und dieses Protein auch synthetisieren.

Nimmt man an, dass es sich bei den CD4<sup>low</sup>-Zellen um LGL oder Monozyten handelt, so ist die Ursache der Korrelation zwischen CD4<sup>low</sup> und IL-8 Expression geklärt.

Erstaunlicherweise ist diese Korrelation nur unter Hypoxie zu beobachten, was durch den verstärkenden Effekt der Hypoxie auf die Expression von IL-8 erklärbar wäre. In einer Untersuchung zum Krankheitsbild der akuten generalisierten exanthematösen Pustulose (AGEP) konnte die Gruppe um Schaerli et al. entgegen den Beobachtungen von Smyth et al. nachweisen, dass T-Lymphozyten nicht in ihrer IL-8 Expression auf posttranskriptioneller Ebene geblockt werden. Sie sind in der Lage sind, das Zytokin tatsächlich zu exprimieren (35).

Die in den **Tabellen 4a und 4b** dargestellten Korrelationen lassen eine generelle, sauerstoffunabhängige positive Korrelation zwischen IL-8 und dem Anteil an schwach positiven CD4-Zellen ( $CD4^{low}$ ) sowie eine positive Korrelation zwischen der TNF- $\alpha$  und der IL-2 Expression erkennen. Die Erläuterungen aus der Diskussion um die **Tabellen 3a und 3b** lassen sich auch hier anwenden. Interessant ist, dass sich der Zusammenhang zwischen IL-8 und  $CD4^{low}$  in Abwesenheit von Glukose als unabhängig von der Sauerstoffversorgung der Zellen zeigt. Es verdichtet sich die Vermutung, dass bei den stimulierten Zellsuspensionen die  $CD4^{low}$ -Zellen für die IL-8 Expression von Bedeutung ist. Es wäre interessant herauszufinden, welchen spezifischen Phänotyp diese  $CD4^{low}$ -Zellen aufweisen, und ob sie möglicherweise den LGL-Zellen von Smyths Untersuchungen entsprechen. Die weiterhin beobachtbare positive Korrelation zwischen IL-2 und TNF- $\alpha$  ist auf die Stimulation der Zellen als kleinsten gemeinsamen Nenner zurückzuführen. Hierbei ist erstaunlich, dass sich diese Korrelation von einem rein unter Normoxie beobachtbaren Phänomen zu einem generellen verändert hat. Somit scheint die Anwesenheit der Glukose in Verbindung mit Hypoxie den Zusammenhang zwischen der Expression von TNF- $\alpha$  und IL-2 unter PMA-/Ionomycinstimulation zu maskieren. Diese Maskierung hängt möglicherweise mit einer unterschiedlichen Sensitivität der Synthesewege auf Glukose für die beiden Zytokine zusammen. Für die Synthese von TNF- $\alpha$  ist bereits ein suppressiver Effekt von Glukose und Osmolarität bei stimulierten PBMCs gezeigt worden (94). Für IL-2 liegen hierzu keine Daten vor. Hat Glukose auf die Expression von TNF- $\alpha$  einen anderen Effekt als auf die von IL-2, so erklären sich daraus die Unterschiede der Korrelationsdaten unter den verschiedenen Bedingungen.

Bei den Verhältnissen unter glukosefreier Normoxie fällt auf, dass IL-6 mit IL-1 $\beta$  und IL-2 korreliert. Ein Zusammenhang aller drei Zytokine stellt sich über ihre Funktion als pro-

inflammatorische Zytokine dar. Houssiau et al. postulierten einen Zusammenhang der drei Zytokine in humanen T<sub>H</sub>-Zellen. Während IL-1 die Expression von IL-2 verstärkt, bewirkt IL-6 ein besseres Ansprechen der T-Lymphozyten auf einen IL-2 Proliferationsstimulus. Insofern wirken IL-1 und IL-6 synergistisch auf die IL-2-Antwort der T-Lymphozyten. Wahrscheinlich wirkt IL-6 durch eine Überführung der Zellen von der G0 in die G1 Phase des Zellzyklus (21). Möglicherweise stellt der von Houssiau beobachtete Zusammenhang die Ursache für das oben genannte Korrelationsmuster dar. Wendet man sich den weiteren Korrelationen unter Normoxie in **Tabelle 4a** zu, so findet man einen möglichen Zusammenhang zwischen der MCAF Produktion und der IL-8 Expression. Da beide Zytokine als hauptsächlich von Monozyten exprimierte Proteine bekannt sind, ist der mögliche Zusammenhang in einer gemeinsamen Quelle zu sehen. Betrachtet man die CD4<sup>low</sup>-Zellen als vorwiegend monozytär, was in einer späteren flowzytometrischen Charakterisierung mit der Auswahl geeigneter Oberflächenmarker gezeigt werden muss, so ergibt sich eine Erklärung für die vorliegenden Korrelationsdaten. Betrachtet man die in **Tabelle 4b** angegebenen Korrelationen in der Hypoxiespalte, so ergibt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen der Quantität von IL-1 $\beta$  und dem Anteil von CD4<sup>low</sup>-Zellen an der Suspension. Hier lässt sich vermuten, dass die IL-1 $\beta$  Produktion von diesen Zellen beeinflusst wird. Die Frage ist, ob diese Zellen direkte IL-1 $\beta$  Produzenten sind oder ob sie die größere Population der deutlich CD4 positiven Zellen dazu anregt, IL-1 $\beta$  zu produzieren. Aufklärung in dieser Frage würde eine intrazelluläre Färbung gegen IL-1 $\beta$  bringen.

### 5 Zusammenfassung

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Experimente zeigen, dass stimulierte  $CD4^+$ -Zellen von gesunden Normalspendern unter dem Einfluss einer sinkenden Sauerstoffversorgung (Hypoxie) vermehrt proinflammatorische und chemotaktisch wirksame Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-2, sowie zur Differenzierung notwendige antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, ausschütten. Die Verfügbarkeit von Glukose hat einen verstärkenden Effekt auf die hypoxieinduzierte Expressionssteigerung von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 und MCAF. Eine hypoxische Umgebung sorgt in Abhängigkeit von der Versorgung mit Glukose für eine Anpassung der zellulären Atmungsrate, wobei Glukosemangel zu einer verstärkten Utilisation des vorhandenen Sauerstoffs führt. Die Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes belegt, dass Glukose für eine Aufrechterhaltung eines konstanten intrazellulären ATP-Levels verantwortlich ist. Somit ist die glykolytische Energiegewinnung unter Hypoxie in der Lage den Verlust, der durch das Fehlen der OXPHOS bei Sauerstoffmangel entsteht, zu kompensieren. Unter normoxischen Bedingungen sind stimulierte  $CD4^+$ -Zellen unter Glukosemangel nicht in der Lage ihr Überleben zu sichern. Die Expressionsstärke des Hypoxia-inducible-factors-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ist abhängig von der generellen Glukoseverfügbarkeit. Hypoxie führt bei stimulierten  $CD4^+$ -Zellen bei freier Glukoseverfügbarkeit zu einer vermehrten Transkription des Hexokinase1-Gens. Glukosemangel bewirkt dagegen in hypoxischer Umgebung eine Transkriptionssteigerung des SOD1-Gens. Glukose dient in  $CD4^+$ -Zellen dem Überleben und der Aufrechterhaltung eines stabilen Energieniveaus sowie eines proinflammatorischen Zytokinmilieus. Sie unterdrückt die Transkriptionssteigerung des SOD1-Gens, bewirkt aber auch durch Glykolysierung eine Funktionssteigerung des Enzyms und greift somit regulativ in den Radikalstoffwechsel der Zellen ein. Sauerstoffmangel trägt zur Steigerung der proinflammatorischen Potenz und zum Überleben der Zellen bei. Sauerstoffmangel und Glukoseverfügbarkeit verstärken sich gegenseitig in den genannten Funktionen und ermöglichen eine der Entzündungssituation angepasste Reaktion der Lymphozyten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Romagnani, S. (2004) Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113, 395-400
2. Kuby, J. (1997) Immunology, Freeman, New York
3. Dombrowski, K. E., Cone, J. C., Bjorndahl, J. M., and Phillips, C. A. (1995) Irreversible inhibition of human natural killer cell natural cytotoxicity by modification of the extracellular membrane by the adenine nucleotide analog 5'-p-(fluorosulfonyl)benzoyl adenosine. *Cell Immunol* 160, 199-204
4. Langston, H. P., Ke, Y., Gewirtz, A. T., Dombrowski, K. E., and Kapp, J. A. (2003) Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 170, 2962-2970
5. Garber, K. (2004) Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J Natl Cancer Inst* 96, 1805-1806
6. Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12, 149-162
7. Mor, F., Quintana, F. J., and Cohen, I. R. (2004) Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol* 172, 4618-4623
8. Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., and Wenger, R. H. (1997) Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 272, 20055-20062
9. Lok, C. N., and Ponka, P. (1999) Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 274, 24147-24152
10. Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B., and Fox, P. L. (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* 275, 21048-21054
11. Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T., and Miura, T. (2000) Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem* 275, 14139-14146
12. Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., and Ratcliffe, P. J. (2000) Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene* 19, 6297-6305
13. Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., and Wang, G. L. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269, 23757-23763
14. Bruick, R. K., and McKnight, S. L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337-1340
15. Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (1999) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94, 1561-1567
16. Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Maltezos, E., Athanassou, N., Papazoglou, D., Gatter, K. C., Harris, A. L., and Koukourakis, M. I. (2003) Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 5, R193-201
17. Zhou, J., Schmid, T., and Brune, B. (2003) Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 14, 2216-2225

18. Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Athanassou, N., Zois, E., Thorpe, P. E., Brekken, R. A., Gatter, K. C., Harris, A. L., Koukourakis, I. M., and Koukourakis, M. I. (2001) The angiogenic pathway "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR)-receptor" in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Pathol* 194, 101-108
19. Paleolog, E. M., Young, S., Stark, A. C., McCloskey, R. V., Feldmann, M., and Maini, R. N. (1998) Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41, 1258-1265
20. Burger, D. (2000) Cell contact-mediated signaling of monocytes by stimulated T cells: a major pathway for cytokine induction. *Eur Cytokine Netw* 11, 346-353
21. Houssiau, F. A., Coulie, P. G., and Van Snick, J. (1989) Distinct roles of IL-1 and IL-6 in human T cell activation. *J Immunol* 143, 2520-2524
22. Kuhweide, R., Van Damme, J., Lorre, K., Baroja, M. L., Tsudo, M., and Ceuppens, J. L. (1990) Accessory cell-derived helper signals in human T-cell activation with phytohemagglutinin: induction of interleukin 2-responsiveness by interleukin 6, and production of interleukin 2 by interleukin 1 [corrected]. *Cytokine* 2, 45-54
23. Tosato, G., and Jones, K. D. (1990) Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood* 75, 1305-1310
24. Haddad, J. J. (2002) Recombinant human interleukin (IL)-1 beta-mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism. *Eur Cytokine Netw* 13, 250-260
25. Lowenthal, J. W., Zubler, R. H., Nabholz, M., and MacDonald, H. R. (1985) Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes. *Nature* 315, 669-672
26. Seigel, L. J., Harper, M. E., Wong-Staal, F., Gallo, R. C., Nash, W. G., and O'Brien, S. J. (1984) Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. *Science* 223, 175-178
27. Weinberg, K., and Parkman, R. (1990) Severe combined immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. *N Engl J Med* 322, 1718-1723
28. Hollander, G. A., Zuklys, S., Morel, C., Mizoguchi, E., Mobisson, K., Simpson, S., Terhorst, C., Wishart, W., Golan, D. E., Bhan, A. K., and Burakoff, S. J. (1998) Monoallelic expression of the interleukin-2 locus. *Science* 279, 2118-2121
29. Bendiksen, S., and Rekvig, O. P. (2004) Interleukin-2, but not interleukin-15, is required to terminate experimentally induced clonal T-cell anergy. *Scand J Immunol* 60, 64-73
30. Houssiau, F., and Van Snick, J. (1992) IL6 and the T-cell response. *Res Immunol* 143, 740-743
31. Sutherland, G. R., Baker, E., Callen, D. F., Hyland, V. J., Wong, G., Clark, S., Jones, S. S., Eglinton, L. K., Shannon, M. F., Lopez, A. F., and et al. (1988) Interleukin 4 is at 5q31 and interleukin 6 is at 7p15. *Hum Genet* 79, 335-337
32. Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Humphries, S., and Woo, P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102, 1369-1376
33. Roodman, G. D., Kurihara, N., Ohsaki, Y., Kukita, A., Hosking, D., Demulder, A., Smith, J. F., and Singer, F. R. (1992) Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 89, 46-52



34. Smyth, M. J., Zachariae, C. O., Norihisa, Y., Ortaldo, J. R., Hishinuma, A., and Matsushima, K. (1991) IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *J Immunol* 146, 3815-3823
35. Schaerli, P., Britschgi, M., Keller, M., Steiner, U. C., Steinmann, L. S., Moser, B., and Pichler, W. J. (2004) Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation. *J Immunol* 173, 2151-2158
36. Kunz, M., Hartmann, A., Flory, E., Toksoy, A., Koczan, D., Thiesen, H. J., Mukaida, N., Neumann, M., Rapp, U. R., Brocker, E. B., and Gillitzer, R. (1999) Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness. *Am J Pathol* 155, 753-763
37. Mukaida, N., Harada, A., and Matsushima, K. (1998) Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 9-23
38. de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E. (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209-1220
39. Willems, F., Marchant, A., Delville, J. P., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M., and Goldman, M. (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol* 24, 1007-1009
40. de Waal Malefyt, R., Yssel, H., and de Vries, J. E. (1993) Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4<sup>+</sup> T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 150, 4754-4765
41. Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1998) Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 160, 3188-3193
42. Taga, K., Cherney, B., and Tosato, G. (1993) IL-10 inhibits apoptotic cell death in human T cells starved of IL-2. *Int Immunol* 5, 1599-1608
43. Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H., and Gallagher, G. (1997) Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 46, 120-128
44. Gibson, A. W., Edberg, J. C., Wu, J., Westendorp, R. G., Huizinga, T. W., and Kimberly, R. P. (2001) Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166, 3915-3922
45. Asadullah, K., Eskdale, J., Wiese, A., Gallagher, G., Friedrich, M., and Sterry, W. (2001) Interleukin-10 promoter polymorphism in psoriasis. *J Invest Dermatol* 116, 975-978
46. Schotte, H., Schluter, B., Drynda, S., Willeke, P., Tidow, N., Assmann, G., Domschke, W., Kekow, J., and Gaubitz, M. (2004) Interleukin-10 promoter microsatellite polymorphisms are associated with response to long term treatment with etanercept in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*
47. Kokura, S., Wolf, R. E., Yoshikawa, T., Granger, D. N., and Aw, T. Y. (2000) T-lymphocyte-derived tumor necrosis factor exacerbates anoxia-reoxygenation-induced neutrophil-endothelial cell adhesion. *Circ Res* 86, 205-213
48. Dayer, J. M., Beutler, B., and Cerami, A. (1985) Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 162, 2163-2168
49. Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J.,

- March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729-733
50. Spies, T., Morton, C. C., Nedospasov, S. A., Fiers, W., Pious, D., and Strominger, J. L. (1986) Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8699-8702
51. Ragoussis, J., Bloemer, K., Weiss, E. H., and Ziegler, A. (1988) Localization of the genes for tumor necrosis factor and lymphotoxin between the HLA class I and III regions by field inversion gel electrophoresis. *Immunogenetics* 27, 66-69
52. Corrigan, V. M., Arastu, M., Khan, S., Shah, C., Fife, M., Smeets, T., Tak, P. P., and Panayi, G. S. (2001) Functional IL-2 receptor beta (CD122) and gamma (CD132) chains are expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol* 166, 4141-4147
53. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24, 104-108
54. Caldwell, C. C., Kojima, H., Lukashev, D., Armstrong, J., Farber, M., Apasov, S. G., and Sitkovsky, M. V. (2001) Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J Immunol* 167, 6140-6149
55. Hale, L. P., Braun, R. D., Gwinn, W. M., Greer, P. K., and Dewhirst, M. W. (2002) Hypoxia in the thymus: role of oxygen tension in thymocyte survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1467-1477
56. Lund-Olesen, K. (1970) Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum* 13, 769-776
57. Wallis, W. J., Simkin, P. A., and Nelp, W. B. (1985) Low synovial clearance of iodide provides evidence of hypoperfusion in chronic rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 28, 1096-1104
58. Romero-Alvira, D., and Roche, E. (1998) The keys of oxidative stress in acquired immune deficiency syndrome apoptosis. *Med Hypotheses* 51, 169-173
59. Long, A., Kelleher, D., Lynch, S., and Volkov, Y. (2001) Cutting edge: protein kinase C beta expression is critical for export of IL-2 from T cells. *J Immunol* 167, 636-640
60. Dreikhausen, U. E., Gorf, K., Resch, K., and Szamel, M. (2003) Protein kinase Cbeta1, a major regulator of TCR-CD28-activated signal transduction leading to IL-2 gene transcription and secretion. *Int Immunol* 15, 1089-1098
61. Foey, A. D., and Brennan, F. M. (2004) Conventional protein kinase C and atypical protein kinase Czeta differentially regulate macrophage production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Immunology* 112, 44-53
62. Na, Y. J., Jeon, Y. J., Suh, J. H., Kang, J. S., Yang, K. H., and Kim, H. M. (2001) Suppression of IL-8 gene expression by radicicol is mediated through the inhibition of ERK1/2 and p38 signaling and negative regulation of NF-kappaB and AP-1. *Int Immunopharmacol* 1, 1877-1887
63. Kim, H. Y., and Rikihisa, Y. (2002) Roles of p38 mitogen-activated protein kinase, NF-kappaB, and protein kinase C in proinflammatory cytokine mRNA expression by human peripheral blood leukocytes, monocytes, and neutrophils in response to *Anaplasma phagocytophila*. *Infect Immun* 70, 4132-4141
64. Krauss, S., Buttgerit, F., and Brand, M. D. (1999) Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1412, 129-138
65. Brand, K. A., and Hermfisse, U. (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *Faseb J* 11, 388-395

66. Naldini, A., and Carraro, F. (1999) Hypoxia modulates cyclin and cytokine expression and inhibits peripheral mononuclear cell proliferation. *J Cell Physiol* 181, 448-454
67. Wang, G. S., Qian, G. S., Mao, B. L., Cai, W. Q., Chen, W. Z., and Chen, Y. (2003) [Changes of interleukin-6 and Janus kinases in rats with hypoxic pulmonary hypertension]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 26, 664-667
68. Rydberg, E. K., Salomonsson, L., Hultén, L. M., Noren, K., Bondjers, G., Wiklund, O., Björnheden, T., and Ohlsson, B. G. (2003) Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages. *Atherosclerosis* 170, 245-252
69. Knoferl, M. W., Jarrar, D., Schwacha, M. G., Angele, M. K., Cioffi, W. G., Bland, K. I., and Chaudry, I. H. (2000) Severe hypoxemia in the absence of blood loss causes a gender dimorphic immune response. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C2004-2010
70. Kim, N. G., Lee, H., Son, E., Kwon, O. Y., Park, J. Y., Park, J. H., Cho, G. J., Choi, W. S., and Suk, K. (2003) Hypoxic induction of caspase-11/caspase-1/interleukin-1 $\beta$  in brain microglia. *Brain Res Mol Brain Res* 114, 107-114
71. Bosco, M. C., Puppo, M., Pastorino, S., Mi, Z., Melillo, G., Massazza, S., Rapisarda, A., and Varesio, L. (2004) Hypoxia selectively inhibits monocyte chemoattractant protein-1 production by macrophages. *J Immunol* 172, 1681-1690
72. Safronova, O., Nakahama, K., Onodera, M., Muneta, T., and Morita, I. (2003) Effect of hypoxia on monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression induced by Interleukin-1 $\beta$  in human synovial fibroblasts. *Inflamm Res* 52, 480-486
73. Jeong, H. J., Chung, H. S., Lee, B. R., Kim, S. J., Yoo, S. J., Hong, S. H., and Kim, H. M. (2003) Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 805-811
74. Jung, Y. J., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003) IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NF $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *Faseb J* 17, 2115-2117
75. Stiehl, D. P., Jelkmann, W., Wenger, R. H., and Hellwig-Burgel, T. (2002) Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 512, 157-162
76. Williams, R. O., Marinova-Mutafchieva, L., Feldmann, M., and Maini, R. N. (2000) Evaluation of TNF- $\alpha$  and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF- $\alpha$ /anti-CD4 therapy. *J Immunol* 165, 7240-7245
77. Bresnihan, B., Alvaro-Gracia, J. M., Cobby, M., Doherty, M., Domljan, Z., Emery, P., Nuki, G., Pavelka, K., Rau, R., Rozman, B., Watt, I., Williams, B., Aitchison, R., McCabe, D., and Musikic, P. (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 41, 2196-2204
78. Jeschke, M. G., Klein, D., Bolder, U., and Einspanier, R. (2004) Insulin attenuates the systemic inflammatory response in endotoxemic rats. *Endocrinology* 145, 4084-4093
79. Liese, A. M., Siddiqi, M. Q., Siegel, J. H., Deitch, E. A., and Spolarics, Z. (2002) Attenuated monocyte IL-10 production in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient trauma patients. *Shock* 18, 18-23
80. Kuga, S., Otsuka, T., Niino, H., Nunoi, H., Nemoto, Y., Nakano, T., Ogo, T., Umei, T., and Niho, Y. (1996) Suppression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase. *Exp Hematol* 24, 151-157
81. Walmsley, S. R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A. M., Cowburn, A. S., Johnson, N., and Chilvers, E. R.

- (2005) Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 $\alpha$ -dependent NF- $\kappa$ B activity. *J Exp Med* 201, 105-115
82. Stefanelli, C., Bonavita, F., Stanic, I., Farruggia, G., Falcieri, E., Robuffo, I., Pignatti, C., Muscari, C., Rossoni, C., Guarnieri, C., and Caldarera, C. M. (1997) ATP depletion inhibits glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. *Biochem J* 322 ( Pt 3), 909-917
  83. Hata, H., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Azuma, Y., Kanai, C., Moriizumi, E., Nomura, T., Nakamura, T., and Sakaguchi, S. (2004) Distinct contribution of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-10 to T cell-mediated spontaneous autoimmune arthritis in mice. *J Clin Invest* 114, 582-588
  84. Yasuda, S., Arii, S., Mori, A., Isobe, N., Yang, W., Oe, H., Fujimoto, A., Yonenaga, Y., Sakashita, H., and Imamura, M. (2004) Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  and its significance. *J Hepatol* 40, 117-123
  85. Winder, W. W., Holmes, B. F., Rubink, D. S., Jensen, E. B., Chen, M., and Holloszy, J. O. (2000) Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88, 2219-2226
  86. Murakami, K., Kanno, H., Tancabelic, J., and Fujii, H. (2002) Gene expression and biological significance of hexokinase in erythroid cells. *Acta Haematol* 108, 204-209
  87. Murakami, K., Kanno, H., Miwa, S., and Piomelli, S. (1999) Human HKR isozyme: organization of the hexokinase I gene, the erythroid-specific promoter, and transcription initiation site. *Mol Genet Metab* 67, 118-130
  88. Ackerman, A. D., Fackler, J. C., Tuck-Muller, C. M., Tarpey, M. M., Freeman, B. A., and Rogers, M. C. (1988) Partial monosomy 21, diminished activity of superoxide dismutase, and pulmonary oxygen toxicity. *N Engl J Med* 318, 1666-1669
  89. Liochev, S. I., and Fridovich, I. (2000) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *J Biol Chem* 275, 38482-38485
  90. Yim, M. B., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (1993) Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *J Biol Chem* 268, 4099-4105
  91. Takamiya, R., Takahashi, M., Myint, T., Park, Y. S., Miyazawa, N., Endo, T., Fujiwara, N., Sakiyama, H., Misonou, Y., Miyamoto, Y., Fujii, J., and Taniguchi, N. (2003) Glycation proceeds faster in mutated Cu, Zn-superoxide dismutases related to familial amyotrophic lateral sclerosis. *Faseb J* 17, 938-940
  92. Mekhail, K., Gunaratnam, L., Bonicalzi, M. E., and Lee, S. (2004) HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol* 6, 642-647
  93. Zhang, H. G., Hyde, K., Page, G. P., Brand, J. P., Zhou, J., Yu, S., Allison, D. B., Hsu, H. C., and Mountz, J. D. (2004) Novel tumor necrosis factor  $\alpha$ -regulated genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 420-431
  94. Cendoroglo, M., Sundaram, S., Jaber, B. L., and Pereira, B. J. (1998) Effect of glucose concentration, osmolality, and sterilization process of peritoneal dialysis fluids on cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear cell functions in vitro. *Am J Kidney Dis* 31, 273-282

## **Danksagung**

### **Widmung und Danksagung**

Meine Dissertation habe ich meinem Bruder André und meiner Mutter Ursula gewidmet.

Meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Frank Buttgereit möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und für seinen vielseitigen fachlichen Rat danken.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Timo Gaber-Elsner und Herrn Robert Tripmacher für die fachliche Beratung und angeregte Diskussionen sowie für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden.

Meine Freunde Franca und Bärbel Pursch und Claas Reim kamen vielen grammatikalischen, orthographischen und strukturellen Schnitzern auf die Spur. Hiermit bedanke ich mich für ihre großartige Unterstützung.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 3.5.2005

## Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 5** Abkürzungsverzeichnis

5'-AMP	5'-Adenosinmonophosphat
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AP-1	Activator protein 1
APC	Antigen presenting cell
APS	Ammoniumpersulphat
ARNT	Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	clonale DNA
Con A	Concavalin A
COX	Cyclooxygenase
CXC	Chemokinfamilie
ddNTPs	Didesoxynucleotidtriphosphate
ECL	Electrochemoluminiszenz
ECO-I	Restriktionsenzym-I
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoetin
ERK1 & 2	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FLS	Fibroblast like synoviocytes
FRAP	FKBP-rapamycin associated protein
GLUT-4	Glukosetransporter Typ 4
GM-CSF; G-CSF	Granulocyte-monocyte colony stimulating factor; Granulocyte colony stimulating factor
HBS	HIF binding site
HEK293	Human embryonic kidney cells
HIF	Hypoxia inducible factor
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
HRP	Horseradish peroxidase
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN $\gamma$	Interferone gamma
IgG, IgM, IgA	Immunoglobulin Klasse G,M,A
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-10	Interleukin-10
IL-2	Interleukin-2
JNK	Jun terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
LGL	Large granular lymphocytes
LLC-PK <sub>1</sub>	Nierenepithelzelllinie (prox. Tubulus)
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic activated cell sorting

## Abkürzungsverzeichnis

MCP-1/ MCAF	Monocyte chemoattractant protein-1/
MHC/ HLA	Major histocompatibility complex / Human leukocyte antigen
mRNA	Mitochondriale Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NFκB	Nuclear factor kappa-B
N-FAT	Nuclear factor of activated T-cells
NK-ZELLEN	Natural killer cells
OA	Osteoarthritis
ODD	Oxygen dependant domain
Oligo-dTs	Polydesoxypyrimidine
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
PBA	mit Natriumazid versetztes PBS/BSA
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS / BSA	Phosphate buffer saline / Bovine serum albumin
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerithrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E-2
PHA	Phytohaemagglutinin
PI-3K/Akt	Phosphatidylinositol 3-kinase/
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVHL	von Hippel-Lindau Protein
RA	Rheumatoide Arthritis
RAF/MEK/MAPK	Signalkaskade (RAF,Mitogen Activated Protein kinase kinase 1/MAP kinase)
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RF	Rheumafaktor
RLUs	Relative light units
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium
RTK	Receptor tyrosine kinase
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SEM	Standard error of the mean
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOC	Nährmedium für E.coli
SOD	Superoxide dismutase
TACE	TNF-α converting enzyme
TBS-Tween	Tris-buffered saline with Tween
TCR	T-cell receptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine



## Abkürzungsverzeichnis

TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
T <sub>H</sub> -ZELLE	T-helper cell
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TOPO-TA	Vektorbezeichnung
VEGF	Vasoendothelial growth factor
ZAP-70	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase (70 kDa)